UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ DES SCIENCES D'ALGER
ANNÉE 1941 — N° 2

Sur diverses souches de Bacilles Acido-Résistants Paratuberculeux Saprophytes

Contribution à l'étude des Bacilles Acido-Résistants

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université d'Alger

(*Mention Sciences*)

présentée et soutenue publiquement le 11 Juillet 1941

par

CABASSO Victor

Ancien élève de l'Institut Pasteur (Paris)
et de l'Institut Pasteur de Tunis
Né le 21 Juin 1915 à Port-Saïd (Egypte)

MEMBRES DU JURY

MM. MAIRE, Professeur, Botanique générale et appliquée..... Président
KILLIAN, Professeur, (T. P.) Botanique agricole..... } Juges
PINOY, Professeur, Bactériologie (*Médecine et Pharmacie*) }

TUNIS
IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
1941

UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ DES SCIENCES D'ALGER
ANNÉE 1941 — N° 2

Sur diverses souches de Bacilles Acido-Résistants Paratuberculeux Saprophytes

Contribution à l'étude des Bacilles Acido-Résistants

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université d'Alger

(*Mention Sciences*)

présentée et soutenue publiquement le Juillet 1941

par

CABASSO Victor

Ancien élève de l'Institut Pasteur (Paris)

et de l'Institut Pasteur de Tunis

Né le 21 Juin 1915 à Port-Saïd (Egypte)

MEMBRES DU JURY

MM. MAIRE, Professeur, Botanique générale et appliquée..... Président
KILLIAN, Professeur, (T. P.) Botanique agricole..... } Juges
PINOY, Professeur, Bactériologie (*Médecine et Pharmacie*) }

TUNIS
IMPRIMERIE BASCONE & MUSCAT
41, AVENUE DE LONDRES
1941

UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen	MM.	ROYER
Assesseur		VÉRAIN
Secrétaire		SOLÉRA

PROFESSEURS

Mathématiques générales	MM.	N...
Mécanique rationnelle et appliquée		BOURION
Astronomie et Astrophysique		MEYER, (I. ⁂)
Physique générale		N...
Physique industrielle		VÉRAIN, (I. ⁂)
Chimie générale		ROLLET, (A. ⁂)
Chimie appliquée		GUNTZ, (I. ⁂)
Zoologie		N...
Biologie générale et appliquée		ROSE, (I. ⁂)
Botanique générale et appliquée		MAIRE, (✲, I. ⁂)
Géologie et Minéralogie		SAVORNIN, (I. ⁂)
Minéralogie et Cristallographie		ROYER, (I. ⁂)
Géologie appliquée à l'agriculture et à l'industrie		DALLONI, (✲, I. ⁂, ❋)

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Botanique agricole	M.	KILLIAN, (I. ⁂)

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Physique (P. C. B.)	M.	MENDOUSSE, (A. ⁂)

MAITRES DE CONFÉRENCES

Mathématiques générales	MM.	N...
Chimie (P. C. B.)		BERLANDE, (I. ⁂)
Biologie animale (P. C. B.)		GAUTHIER, (✲, ❀, I. ⁂)

MAITRE DE CONFÉRENCE-ADJOINT

Chimie appliquée	M.	SIROT, (I. ⁂)

CHEFS DE TRAVAUX

Physique	M.	SAVORNIN
Chimie	Mlle	PEYTRAL, (I. ⁂)
Botanique	Mme	GAUTHIER, (I. ⁂)
Zoologie	M.	DIEUZEIDE, (A. ⁂)

HONORARIAT

Doyen et Professeur	MM.	ROUYER, (O. ✲, I. ⁂)
Professeur		MULLER, (✲, I. ⁂)
Professeur		FOIX, (I. ⁂)
Professeur		LAGRULA, (I. ⁂)
Professeur		SEURAT, (✲, I. ⁂)

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MES FRÈRES ET A MES SŒURS

En témoignage de ma plus profonde affection.

A Monsieur le Docteur Etienne BURNET

Directeur

de l'Institut Pasteur de Tunis

Commandeur de la Légion d'honneur

qui nous a accueilli avec bienveillance dans ses laboratoires et nous a prodigué ses conseils et ses encouragements.

Nous lui sommes très reconnaissant de l'intérêt qu'il a bien voulu nous témoigner.

A Monsieur le Docteur A. BOQUET

Chef de Service

à l'Institut Pasteur de Paris

qui nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542710_0031

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur R. MAIRE

Professeur

de Botanique Générale et Appliquée

à la Faculté des Sciences d'Alger

qui a bien voulu présider cette thèse.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur KILLIAN

Professeur (T. P.)

de Botanique Agricole

à la Faculté des Sciences d'Alger

Monsieur le Professeur PINOY

Professeur de Bactériologie

aux Facultés de Médecine et de Pharmacie d'Alger

A NOS MAITRES
DE L'UNIVERSITÉ HÉBRAIQUE DE JÉRUSALEM

Monsieur le Professeur I. KLIGLER
Monsieur le Docteur L. OLITZKY
Monsieur le Docteur ASHNER

Hommage et reconnaissance.

A NOTRE COLLABORATEUR ET AMI
Monsieur le Docteur W. SCHAEFER
Institut Pasteur de Paris
Laboratoire de Recherches sur la Tuberculose

en témoignage d'amical souvenir.

A MM. Henri ROUSSEL et Georges CARRÉ
Préparateurs à l'Institut Pasteur de Tunis
A TOUT LE PERSONNEL DE L'INSTITUT

qui nous ont témoigné leur sympathie durant tout notre séjour à Tunis.

Qu'ils trouvent ici un témoignage de notre sincère amitié.

Sur diverses souches de bacilles acido-résistants paratuberculeux saprophytes.

Contribution à l'étude des bacilles acido-résistants.

I. - Introduction et Historique

L'acido-résistance est la propriété que possèdent certaines espèces de microorganismes, de résister, après coloration, à la fuschine par exemple, à la décoloration par un acide dilué ou par l'alcool. Cette propriété est utilisée pour l'identification des bacilles tuberculeux humains, bovins ou aviaires, ainsi que pour celle des bacilles de la lèpre humaine (bacille de Hansen) et du la lèpre des rats (bacille de Stéphansky).

Cependant, il existe un peu partout dans la nature, toute une série de bacilles possédant cette même propriété des bacilles tuberculeux et lépreux, et n'ayant pas pour cela leur action pathogène. On les désigne généralement sous le nom de : bacilles acido-résistants paratuberculeux.

Il est vrai que certains d'entre ces bacilles déterminent des troubles morbides chez les animaux auxquels on les injecte. Tel le bacille de la Fléole ou Timotheebacillus de Moeller qui, inoculé dans la cavité péritonéale du cobaye, tue parfois cet animal en un ou deux jours et l'on trouve alors des bacilles dans le sang, ou bien détermine l'amaigrissement de l'animal qui meurt au bout de 5 à 6 semaines en montrant à l'autopsie quelques nodules blanchâtres sur le péritoine, des fausses membranes adhérentes aux anses intestinales, à l'épiploon, au mésentère; des capsules surrénales volumineuses et rouges, quelquefois des nodules dans les poumons. Injecté dans les veines, chez le lapin, ce bacille produit souvent des lésions qui ressemblent étrangement à la tuberculose. Tel également le bacille découvert aussi par Moeller dans le fumier des vaches : le Mistbacillus.

Le bacille de Johne représente, dans le groupe que nous considérons, la seule espèce de bacille acido-résistant réellement pathogène, susceptible de créer une infection transmissible en série. Découvert en 1895 par Johne et Frotingham (1), ce bacille est l'agent d'une entérite contagieuse dite entérite hypertrophiante, qui sévit chez les bovidés en Europe, aux Etats-Unis et ailleurs.

Quant aux autres bacilles acido-résistants, et leur nombre est très grand, ils sont tous très peu ou pas du tout pathogènes. Ils sont capables de produire des lésions lorsqu'on les inocule, ou lorsqu'on les fait ingérer à forte dose à des animaux à sang chaud. Ces lésions offrent un aspect tout à fait particulier : ce sont de véritables amas de microbes et de leucocytes enrobés de fibrine, formant des pseudo-tubercules, mais qui guérissent rapidement par résorption ou digestion intracellulaire et ne sont jamais réinoculables en série à d'autres animaux de même espèce.

La découverte de telles espèces de bacilles dans la nature remonte presque à la même époque que celle du bacille tuberculeux par Koch. Zahn (2) attira le premier l'attention sur la présence dans les crachats d'un sujet non tuberculeux d'éléments microbiens ayant à peu près le même aspect morphologique que le bacille tuberculeux et résistant comme lui à la décoloration par les acides.

Depuis, Alvarez et Tavel (3) et d'autres, signalèrent la présence de bacilles analogues dans le smegma vulvaire ou préputial; Gottstein, Laabs, Bitter (4), dans le cerumen; Cramer, de Giacomi (5), dans le contenu normal de l'intestin humain. Nombreux sont les auteurs qui en montrèrent la fréquence : dans la salive des sujets sains, dans le pus d'un abcès iliaque, dans les crachats des bronchitiques, dans le sang des sujets tuberculeux ou sains, dans le lait, la crème, le beurre, dans le fumier, le fourrage, dans les robinets, les tubes de caoutchouc, les instruments métalliques, dans le sol, les mouches, les graminées. C'est dire qu'ils sont extrêmement répandus.

L'importance qu'on leur a assignée et qu'on leur assigne encore aujourd'hui, provient de leur très grande ressemblance avec le bacille tuberculeux vrai.

Divers moyens permettent cependant de les en différencier : ils sont plus facilement décolorés que les bacilles tuberculeux pathogènes par un mélange d'acide et d'alcool; ils poussent plus facilement, plus rapidement et plus abondamment que les tuberculeux vrais, aussi bien à l'étuve qu'à la température ordinaire.

Il n'en reste pas moins qu'ils ont été et sont encore assez souvent d'ailleurs, la cause de faux diagnostics en matière de tuberculose et des maladies des voies urinaires. Témoins les cas de nombreux

auteurs cités par C. A. Frey et W. A. Hagan (6), qui ont constaté la présence de multiples nodules localisés dans le tissu sous-cutané des bovidés et dûs aux bacilles acido-résistants du sol. Ces auteurs ont pensé que la fréquence de ces lésions rendent fréquemment les animaux sensibles à la tuberculine, de manière telle qu'ils réagissent tout comme s'ils étaient tuberculeux.

D'autres auteurs, continuent Frey et Hagan, croient que le pourcentage de bêtes relativement élevé, classées comme réagissant à la tuberculine « sans lésions apparentes » est dû à une sensibilisation produite par l'ingestion, ou l'entrée à travers des blessures, de bacilles acido-résistants du sol.

Il a été cependant prouvé plus tard, que la sensibilisation à la tuberculine était presque toujours produite par une lésion tuberculeuse, parfois infime et qui échappait à l'examen de ces auteurs.

Il est intéressant de rapporter également ici les conclusions tirées par Van Deinse et Hooghiemster (7) d'un travail qu'ils ont fait sur la résistance à la décoloration des bacilles acido-résistants.

L'alcoolo-résistance, disent ces auteurs, d'un bacille acido-résistant présent dans un produit pathologique, ne suffit pas pour pouvoir ranger ce microorganisme parmi les bacilles tuberculeux. Non seulement certains bacilles paratuberculeux résistent parfaitement à l'action prolongée de l'acide azotique au 1/3 et de l'alcool absolu rectifié, mais pour certains de ces bacilles saprophytes, on voit des éléments, décolorés par l'action prolongée de l'acide, redevenir rouges sous l'influence du contact prolongé avec l'alcool du commerce à 96°. Ce dernier phénomène est dû probablement à la présence de traces d'aldéhydes dans l'alcool du commerce, utilisé dans les laboratoires de bactériologie.

Nous voyons donc l'importance de ces bacilles acido-résistants et constatons l'intérêt et la nécessité de leur étude. Mais jouent-ils un rôle déterminé dans la nature ? On pense qu'ils jouent vraisemblablement un rôle important dans la désintégration des matières grasses; mais on ne sait au juste à quoi s'en tenir sur leur compte. Sont-ils des bacilles tuberculeux vrais qui ont perdu leur virulence par leur adaptation à une vie saprophytique, ou sont-ils des bacilles en voie de devenir pathogènes ou, du moins, susceptibles d'une telle évolution ? Autant de questions auxquelles on ne peut répondre aujourd'hui mais que, probablement, l'étude de ces bacilles et de leur métabolisme arrivera un jour à élucider. Dans ce sens de nombreux travaux ont été effectués par plusieurs auteurs, et certains d'entre eux ont cru pouvoir tuberculiser des mammifères avec des bacilles paratuberculeux. Tels Dubard, Bataillon et Terre (8) avec le bacille pisciaire. Ce dernier, isolé de

carpes, se montra pathogène pour tous les animaux à sang froid et inoffensif pour le cobaye, le lapin et les oiseaux. Après des passages successifs par divers animaux à sang chaud, on ne tarda pas à s'apercevoir qu'il produisait des abcès avec engorgements ganglionnaires et des lésions tuberculeuses viscérales. Il paraissait donc avoir acquis, par ces passages, les propriétés essentielles des bacilles tuberculeux des mammifères.

Mais on sut bientôt que les carpes vivaient dans un ruisseau où l'on déversait les crachats et les déjections d'un tuberculeux, et qu'elles avaient été contaminées en même temps par des bacilles d'origine humaine et par des bacilles paratuberculeux.

Tels aussi les travaux de Kolle, H. Schlossberger et Pfannenstiel (9) et d'autres. Dans les expériences tentées par nombre de ces auteurs de tuberculiser des mammifères avec des bacilles paratuberculeux, il apparaît que leur matériel était presque toujours vicié par quelque contamination accidentelle avec un bacille tuberculeux humain.

Par contre, très nombreux sont ceux qui ne réussirent pas la transformation de bacilles paratuberculeux en bacilles pathogènes.

Les faits ci-dessus mentionnés ne nous autorisent pas, du moins pour le moment, à considérer les bacilles paratuberculeux comme capables d'acquérir, par culture in vivo ou par passages successifs à travers l'organisme des animaux à sang chaud, des propriétés tuberculigènes.

La propriété des bacilles acido-résistants paratuberculeux de résister à l'action décolorante des acides, est-elle innée en eux, ou l'acquièrent-ils par leur adaption à vivre dans les milieux contenant le plus souvent des matières grasses en assez grande quantité ?

Plusieurs expériences ont été exécutées pour répondre à cette question. Les résultats de ces travaux peuvent être résumés comme suit : il n'a pas été possible de conférer l'acido-résistance à un groupe d'organismes non acido-résistants, dont quelques-uns prenaient le Gram et d'autres Gram négatifs, même après plusieurs passages sur des milieux de culture contenant des matières grasses. Inversement il n'a pas été possible non plus de rendre des bacilles acido-résistants non acido-résistants en les cultivant sur des milieux très pauvres en source de carbone. Sans doute certaines souches pouvaient montrer, après un certain nombre de passages, un assez grand pourcentage d'éléments non acido-résistants, mais cette propriété ne pouvait continuer à être obtenue indéfiniment, et le microorganisme reprenait sa propriété première aussitôt qu'on le remettait sur un milieu apte à son bon développement.

D'autre part, d'autres expérimentateurs tels Frey (10), Porter (11), ont cru pouvoir obtenir des bacilles non acido-résistants en partant de paratuberculeux, en ajoutant à leurs milieux des substances qui empêcheraient la formation des lipoides. Leurs expériences, répétées par W. D. Burner (12), n'ont donné aucun résultat probant.

L'acido-résistance semble donc être un caractère qui fait, pour ainsi dire, partie du patrimoine héréditaire du groupe de microorganismes dont nous voulons essayer d'étudier quelques spécimens.

Le but que nous nous sommes proposé dans ce travail a été d'isoler nous-même un certain nombre de bacilles acido-résistants de sources différentes; d'étudier leurs caractères morphologiques, culturels et chimiques; de voir si, en dehors de l'action tuberculigène inexistante chez eux, ils se rapprochent des bacilles tuberculeux vrais par d'autres propriétés, telle que la production de tuberculine, ou par les changements qu'ils font subir aux milieux sur lesquels ils se développent, tel le milieu de Sauton; enfin d'essayer de les ranger dans un certain ordre rationnel en nous basant sur leurs caractères sérologiques, et en employant la méthode de fixation du complément qui a servi à Furth (13), W. Schaefer (14) et d'autres, pour la classification sérologique des différentes souches de bacilles tuberculeux aviaires.

II. - Isolement et caractères mophologiques des souches

Ainsi qu'il a été dit dans le chapitre précédent, les bacilles acido-résistants sont très répandus dans la nature, et les sources dont on peut les isoler sont très variées et nombreuses.

Frey et Hagan (1) constatèrent leur présence dans plus de 100 échantillons de sol qu'ils ont reçu de différents points des Etats-Unis. Max Neisser, à Frankfort, les trouve dans 72 % des 70 robinets qu'il a examinés en différents endroits. Il ajoute que des bacilles acido-résistants furent trouvés même sur l'orifice de robinets qui laissaient s'écouler de l'eau chloratée ou traitée autrement. Ils siègent également dans les tubes de caoutchouc adaptés aux robinets. Mais le fait, d'après Neisser, n'est pas tellement remarquable, puisqu'on les trouve aussi en tous les endroits avoisinant les robinets. Etant donné que le métabolisme de ce groupe de microorganismes, tellement répandus, est remarquable par le fait qu'ils exigent de très petites quantités de matières nutritives, il n'est pas étonnant qu'on les rencontre en grandes quantités sur les orifices des robinets, et même parfois, quoique plus rarement, le long des canalisations. Comment sont-ils amenés à vivre en de tels endroits ? Certains auteurs ont cru pouvoir expliquer leur apport par les matières grasses. Mais tel n'est point l'avis de M. Neisser puisqu'on ne les trouve pas dans les matières grasses elles-mêmes. Eichbaum (2) a donné comme explication la contamination des robinets par la poussière des laboratoires ou des pièces qui en contiennent. Seiffert, à Freiburg, a confirmé cette explication. Mais Neisser n'admet pas cette hypothèse puisqu'il a pu trouver des bacilles acido-résistants sur des robinets qui étaient à l'abri de toute contamination. La contamination de l'extérieur doit cependant être admise dans certains cas, et l'on a pu isoler des acido-résistants de l'eau distillée qui avait longtemps séjourné dans un bocal au laboratoire.

En outre, Eichbaum a pu déceler des acido-résistants dans des réservoirs d'eau, loin dans la montagne, bien protégés dans des souterrains. Les réservoirs d'eau, venant en général en contact avec la terre environnante, soit avant, soit après leur construction, et les bacilles acido-résistants se trouvant en très grande abondance dans le sol, on est tenté de croire que la grande profusion de bacilles trouvés sur les robinets, prend son origine de la non moins grande quantité de bacilles du sol.

Une autre catégorie de bacilles acido-résistants est celle signalée par Jakobitz et Kayser (3); ces auteurs ont pu isoler d'assez nombreux acido-résistants d'instruments de musique à vent. Un fait curieux est le suivant, qu'ils en ont trouvés beaucoup plus sur les instruments en cuivre que sur les instruments en bois. Le cuivre, en petite quantité, semble avoir une action stimulante sur le développement des bacilles acido-résistants, et il est loin d'avoir sur eux le même pouvoir bactéricide qu'il possède vis-à-vis d'autres germes. On emploie d'ailleurs cette particularité pour isoler les acido-résistants des sources qui peuvent les contenir associés à d'autres microorganismes. Signalons encore le bacille isolé en 1938 de l'eau de Seine, par Bablet, Van Deinse et Schwartz (4), celui isolé d'une vipère, en 1939, par Th. Voiculescu (5), et celui, enfin, isolé par R. Laporte (6), en 1939, du pus d'un abcès froid, chez un enfant.

Nous avons nous-même constaté la présence de bacilles acido-résistants dans 9 échantillons de sol sur 9 examinés et prélevés en des endroits différents, dans 4 produits de grattage de robinets et de caoutchouc de robinets, dans le corps de mouches, dans le produit de raclage de plaies d'une truie, aux abattoirs de Tunis, dans les matières fécales de lapin, dans des prélèvements faits directement du contenu de l'intestin grêle d'un mouton et du contenu du gros intestin d'une vache. Enfin, nous les avons également rencontrés sur une plante de la famille des Euphorbiacées, ainsi que sur diverses graminées.

De ces origines diverses, nous avons réussi à isoler en cultures pures 9 souches, qui nous ont servi pour le travail que nous nous sommes proposé : 4 souches nous viennent d'échantillons du sol, dont deux furent prélevés dans les jardins de l'Institut Pasteur de Paris, un troisième dans la banlieue parisienne, sur un champ de luzerne, et le 4e, dans le jardin de l'Institut Pasteur de Tunis; nous désignerons ces souches respectivement par les symboles T_1, T_2, T_3 et T_4.

Deux autres souches ont été isolées de produits de grattage de caoutchouc de robinets différents; ce sont les souches Ca_2 et Ca_1. Deux autres encore ont été isolées de corps de mouches, les souches Mb et Mj; enfin, la souche Truie a été obtenue en partant de produit de raclage de plaies que portait une truie sur toute la surface de la peau.

Des essais infructueux furent faits par nous avec des produits de raclage de plaies humaines, que nous avons pu prélever au Centre de prophylaxie Antoine Cassar, à Tunis, grâce à l'amabilité du Dr Chatelier et de Mlle le Dr Ben Cheikh. Nous n'avons pu, en

effet, déceler la présence d'aucun bacille acido-résistant saprophyte sur plus de 12 produits provenant de plaies bien différentes : ulcères variqueux, ulcères calleux, fistules, plaies infectées, plaies de lépreux, etc...

Ajoutons qu'il nous a été assez pénible d'isoler les différentes souches de bacilles acido-résistants, étant donné l'extrême abondance, ainsi que la grande variété de germes de toutes sortes, avec lesquels ils vivent en association. C'est d'ailleurs la raison qui ne nous a pas permis d'isoler tous les bacilles obervés, n'ayant pu les débarrasser des microorganismes qui les accompagnaient, malgré les différentes méthodes que nous avons employées dans ce but.

Différents moyens sont préconisés pour l'isolement en culture pure des bacilles acido-résistants. La méthode d'enrichissement sur le milieu de Söhngen, préconisée par K. A. Frey et W. A. Hagan, pour l'isolement des bacilles acido-résistants du sol, a été la plus communément employée par nous. Elle consiste à introduire le produit à examiner dans un milieu d'enrichissement dû à Söhngen. Ce milieu se distingue par l'absence totale de source de carbone usuelle. Les bacilles acido-résistants pouvant emprunter cet élément aux hydrocarbures supérieurs comme la paraffine, la benzine ou le pétrole, il suffit d'ajouter au milieu de Söhngen, quelques gouttes de ces hydrocarbures.

Le milieu de Söhngen est ainsi constitué :

Phosphate bipotassique	0,5 gr.
Sulfate de magnésium	0,2 gr.
Chlorure d'ammonium	0,5 gr.
Carbonate de sodium	traces
Eau Q. S. pour	1.000 cc.

Nous avons distribué cette solution, ainsi préparée, dans des fioles d'Erlenmeyer de 200 cc., à raison de 50-60 cc. dans chaque fiole. Après stérilisation à l'autoclave, nous y introduisions le produit à examiner, préalablement broyé dans un mortier stérile, quand il s'agissait d'un échantillon de sol, ou coupé en menus morceaux si c'était une plante; la source de carbone que nous avons couramment employée était de la paraffine solide que nous ajoutions au milieu, après l'ensemencement; la paraffine stérilisée au préalable, est liquifiée avant l'emploi, et à l'aide d'une pipette effilée, on en fait tomber quelques gouttes sur la surface du milieu. Les gouttes de paraffine se solidifient instantanément au contact du liquide, et forment de petites rondelles plates qui surnagent.

Cette méthode nous a permis d'isoler nos souches T_1, T_2, T_3 et T_4, et de cultiver sans toutefois les isoler, les bacilles contenus dans les matières fécales de différents mammifères, ainsi que ceux qui vivent sur certaines plantes.

Les souches Mb, Mj, Ca_2 et Ca_1 furent obtenues au moyen de la méthode à l'acide sulfurique à 15 % : le corps de la mouche ou le

produit de grattage du robinet sont broyés dans un mortier avec un peu de sable stérilisé. On les traite à l'acide sulfurique à 15 % pendant 15-20 minutes. Après neutralisation par la soude à 30 %, avec une solution alcoolique de tournesol comme indicateur, on ensemence plusieurs tubes de milieu de Löweinstein. Ces tubes sont souvent souillés d'autres germes provenant des spores dont on n'a pu se débarrasser par l'acide. Mais après quelques repiquages, on arrive à purifier le bacille acido-résistant.

Toutes les souches que nous avons isolées poussent très bien sur différents milieux, à savoir : milieux à l'œuf de Löweinsten et de Dorset, pomme de terre au bouillon glycériné, pomme de terre à l'eau glycérinée à 5 %, gélose glycérinée à 5 %, ainsi que sur le milieu liquide de Sauton. Les cultures sont en général abondantes, et sont obtenues aussi bien à l'étuve à 37° qu'à la température du laboratoire. La plupart poussent aussi à 47°. Toutes, sauf la souche Ca_1, poussent assez rapidement; en effet, 48 heures après le repiquage, on peut déjà constater la présence d'une mince pellicule à la surface du milieu, quel qu'il soit, dûe au développement de la jeune culture. Quant à la souche Ca_1, le temps d'incubation qui lui est nécessaire est très long, aussi bien à 37° qu'à la température ordinaire, et dépasse parfois largement le temps nécessaire au développement des bacilles tuberculeux vrais.

La souche T_1, isolée d'un échantillon de sol prélevé dans les jardins de l'Institut Pasteur de Paris, a été obtenue par la méthode d'enrichissement sur le milieu de Söhngen, et purifiée sur le milieu de Conn (7) au crystalviolet. Elle présente au microscope un bacille long atteignant la taille d'un bacille tuberculeux humain, et souvent même incurvé comme lui. Dans les vieilles cultures, le bacille est remplacé par une grande quantité de granules acido-résistants. Sur le milieu de Löwenstein, et à la température du laboratoire, on peut avoir une culture déjà après 6 jours. Cette culture est d'un jaune orange très intense; elle est grasse et se ride un peu à la longue. Sur pomme de terre au bouillon glycériné, elle pousse abondamment, et son pigment est plus intense que sur pomme de terre à l'eau glycérinée, sur laquelle elle pousse d'ailleurs très bien. Elle recouvre la pomme de terre d'une pellicule épaisse et plissée, d'une belle couleur jaune-orange.

La souche T_1 pousse également très bien sur la gélose glycérinée à 5 %. A la température ordinaire, elle donne sur ce milieu en 1-2 semaines, une culture assez abondante, plissée et grasse, moins grasse pourtant que la culture obtenue à l'étuve, ce qui la rend un peu plus friable. Le pigment, sur la gélose glycérinée, est moins intense que sur le milieu de Löwenstein. On peut égale-

ment obtenir des cultures, très pauvres d'ailleurs, sur la gélose et sur bouillon ordinaires : le bouillon ordinaire est troublé par la culture et se recouvre d'un voile très mince.

Sur le milieu de Sauton la souche T_1 donne un voile très mince, pigmenté, qui se déchire d'ailleurs aisément pour tomber au fond du ballon. Le milieu se trouble légèrement, et il se forme avec le temps un léger dépôt de bacilles. Le milieu se colore en jaune-ambré d'abord, pour prendre une couleur jaune-orange assez vive à la fin de la culture, qui est à son maximum après 5 semaines d'incubation.

Des frottis du voile, montrent des bacilles acido-résistants très nombreux, avec cependant un certain pourcentage d'éléments non acido-résistants. Ce pourcentage, très faible dans les cultures jeunes, devient plus élevé dans les vieilles cultures.

Il est à noter que le pigment de cette souche, ainsi que celui des autres, est plus intense à la température ordinaire qu'à l'étuve.

La souche T_2 a également été isolée d'un autre échantillon de sol prélevé dans le jardin de l'Institut Pasteur de Paris. Le bacille, en culture sur les différents milieux, présente un aspect souvent polymorphe, notamment dans les cultures jeunes. On y rencontre surtout des bacilles longs; il y a également des éléments de la grandeur d'un coccus, et des bacilles non acido-résistants assez nombreux. Ces derniers éléments doivent très probablement apparaître au moment de la lyse qui a lieu dans cette souche, car ce bacille possède un pouvoir autolytique assez grand. Sur les milieux à l'œuf et à 37°, il pousse aussi rapidement que le bacille T_1, et est d'une couleur orange très nette. Mais la culture a un aspect crémeux et muqueux, et quand on tient le tube verticalement, le liquide très épais qui la forme, finit par s'amasser au fond. L'aspect de la culture est moins visqueux, quoique toujours très lisse et crémeux, quand on fait pousser le bacille T_2 à la température du laboratoire. Le pigment est alors beaucoup plus prononcé.

Sur la gélose glycérinée à 5 % la souche T_2 pousse en voile lisse de nature plus consistante que sur le milieu de Löwenstein; le voile se plisse à la longue et recouvre la surface du milieu de rides très nombreuses. Le bacille T_2 pousse également très bien sur la pomme de terre glycérinée en un enduit gras, lisse et d'une couleur orange légèrement rosée.

Sur le milieu liquide de Sauton, on obtient un voile très mince, de couleur jaune-orange; le milieu est troublé pendant le développement de la culture, et un mince dépôt de bacilles s'amasse au fond du ballon. La couleur du milieu passe d'abord par le

jaune-ambré pour devenir franchement orange à la fin de la culture, qui est à son maximum entre la 4e et la 5e semaine.

La souche T_3 a été isolée d'un échantillon de sol provenant d'un champ de luzerne de la banlieue parisienne. La culture, d'une couleur orange assez foncée, est moins abondante, beaucoup plus sèche et plus friable que celle des deux souches précédentes. D'ailleurs la souche T_3 se met plus difficilement que les 2 premières en suspension dans l'eau physiologique. Elle consiste en un bacille de la longueur du bacille de Koch, et les éléments qu'on y rencontre sont 100 % acido-résistants.

Le voile qui s'obtient sur la gélose glycérinée est très plissé, et de consistance assez muqueuse.

La culture en milieu de Sauton s'obtient au bout d'un temps très long et ne peut guère donner plus qu'un voile jaune excessivement mince. Le milieu lui-même devient trouble et le fond du ballon se recouvre d'un léger dépôt floconneux. La couleur du liquide fonce assez lentement, pour devenir, au bout de 12-15 semaines, orange-brunâtre.

Sur pomme de terre glycérinée la souche T_3 donne une culture humide, grasse et mamelonnée, moins abondante que celle de la souche T_1.

La souche T_4 provient d'un échantillon de sol prélevé dans les jardins de l'Institut Pasteur de Tunis. Cette souche pousse assez abondamment sur les milieux à l'œuf et donne une culture blanche, grasse, mamelonnée, qui sèche en vieillissant et prend l'aspect d'une culture de bacilles de Koch. Elle pousse en peu de jours aussi bien à l'étuve qu'à la température de laboratoire. Cette souche comporte 100 % d'éléments acido-résistants : bacilles moins longs que ceux de la souche T_1, droits et assez trapus.

Sur gélose glycérinée, elle donne à l'étuve, une culture grasse et d'un blanc légèrement sale, tandis qu'à la température du laboratoire on obtient un voile bien blanc, sec, qui se plisse pour former d'innombrables rides sur la surface du milieu. La culture sur pomme de terre glycérinée est abondante et rappelle assez une culture de bacillles tuberculeux aviaires.

Sur le milieu de Sauton, la souche T_4 donne rapidement un voile qui ne se plisse cependant jamais; le voile se fragmente au moindre mouvement et tombe en plaquettes au fond du ballon. Le milieu lui-même ne change presque pas de couleur, et il se dégage de la culture une odeur assez agréable qui rappelle celle des cultures de bacilles aviaires. Quand le voile s'est fragmenté et déposé au fond du ballon, il s'en forme un autre plus mince, qui se frag-

mente et se dépose à son tour, et qui est suivi d'un 3e voile encore plus mince.

Tandis que ces 4 premières souches ont été obtenues et isolées en faisant passer l'échantillon à explorer par le milieu d'enrichissement de Söhngen, la souche Mb, ainsi que celles qui la suivent, a été directement isolée sur le milieu de Löwenstein après avoir traité le corps d'une mouche, finement broyé dans un mortier avec du sable stérile, à l'acide sulfurique à 15 % pendant 15 minutes, et neutralisé avec de la soude à 30 %.

Un frottis de cette souche nous révèle des bacilles 100 % acido-résistants, de la longueur d'un bacille de Koch et un peu plus épais; en moindre quantité on y rencontre aussi des formes petites et trapues. Les cultures sur milieux à l'œuf sont abondantes, commencent par être lisses pendant les premiers jours et de couleur blanche, pour se plisser abondamment et prendre au bout de 5-6 semaines une teinte rosée, quand elles sont mises à la température ordinaire.

Sur la pomme de terre glycérinée, on obtient en quelques jours une culture formée de fines colonies blanc-ivoire, granuleuses, qui prend avec le temps une couleur crème teintée de rose.

Ensemencée sur le milieu de Sauton, cette souche pousse très vite, formant un voile qui s'épaissit et se plisse très rapidement. Le « gâteau » assez épais qui se forme ainsi, finit par tomber au fond du ballon après 4-5 semaines, et un autre voile plus lisse et très fin se forme en surface. Le milieu change très peu de couleur; il devient un peu plus jaune-citron. L'évolution complète de la culture est atteinte en 4-5 semaines. Dans les cultures vieilles de 12 semaines, une grande partie des bacilles est très vraisemblablement lysée dans le milieu, ce qui donne à ce dernier un aspect sirupeux.

Sur la gélose glycérinée à 5 %, le même mode de culture que sur le milieu à l'œuf a lieu, à cela prêt que la culture se plisse aussi abondamment sans devenir cependant rosée, même au bout d'un temps très long, à la température du laboratoire.

Des différentes cultures de cette souche se dégage une assez forte odeur de mimosa comparable à celle des cultures de bacilles tuberculeux vrais.

De même que la souche Mb, la souche Mj a été isolée du corps d'une mouche domestique traité à l'acide sulfurique à 15 % et ensemencé sur le milieu de Löwenstein. Elle présente au microscope des formes polymorphes. Tantôt ce sont des bacilles de la longueur d'un bacille de Koch normal et tantôt on y voit des bacilles de la longueur de 3 bacilles accolés bout à bout. Pas de

formes ramifiées. On y rencontre également parfois, des éléments plus petits à l'aspect coccoïdal. Dans les cultures jeunes, une assez grande quantité d'éléments non acido-résistants.

Cette souche est de couleur jaune-orange très intense. Elle pousse facilement sur le milieu de Löwenstein, et donne une culture grasse, brillante et cependant de consistance assez ferme quand elle est à la température ordinaire; à l'étuve, la culture est de consistance muqueuse, visqueuse, et s'écoule lentement au fond du tube.

Sur la gélose glycérinée, la souche Mj donne une culture en voile de couleur orange très vive; le voile se plisse en plis très nombreux et la culture, grasse et assez brillante, est de consistance ferme.

Sur la pomme de terre glycérinée, on obtient un enduit très gras et très brillant, qui « file » quand on en prélève un morceau au fil de platine. La culture est de couleur jaune-orange teintée de rose.

Sur le milieu de Sauton, le bacille Mj commence à pousser dans le liquide même, le troublant légèrement. Ensuite seulement il se forme, assez vite, un voile jaune, très mince, qui ne tarde pas à s'épaissir et à se plisser pour former un gâteau très épais. Le liquide prend alors une teinte orange-brune très prononcée.

Au moindre mouvement le gâteau se fragmente, et une grande partie tombe au fond du ballon. Le maximum de culture est atteint en 5-6 semaines. Au bout de ce temps, le bacille commence très vraisemblablement à subir une autolyse très intense, puisqu'au bout de 9-10 semaines le liquide devient très épais, et la culture qui s'est entièrement amassée au fond du ballon, prend un aspect sirupeux et « filant » rappelant le jaune d'œuf.

Quant à la souche Ca_2, il nous a été permis de l'isoler en partant du produit de grattage d'un caoutchouc de robinet d'un laboratoire. Ce produit, traité par l'acide sulfurique à 15 %, neutralisé et ensemencé sur le milieu de Löwenstein, a développé des colonies blanc-crême semi-sphériques, sèches, montrant au microscope des éléments 100 % acido-résistants, possédant la longueur d'un bacille tuberculeux, avec parfois des formes petites et trapues.

Le repiquage d'une colonie sur milieu à l'œuf donne une culture blanc-crême, mamelonnée, et qui à la longue constitue un enduit légèrement ondulé, sec et assez friable. Les cultures obtenues à la température ordinaire sont plus sèches et plus friables que celles obtenues à l'étuve.

Sur gélose glycérinée, la culture se fait en voile blanc, épais,

sec et très friable qui se plisse en gros plis, ce qui leur donne l'aspect d'un crêpe de deuil.

La culture sur pomme de terre glycérinée est abondante, très grasse, mamelonnée et de couleur blanc légèrement sale.

La souche Ca_2 pousse très abondamment sur le milieu liquide de Sauton. Au bout de 5 à 6 semaines la culture atteint son poids maximum; un voile très épais et très ridé recouvre alors la surface du liquide. Ce dernier reste limpide et un dépôt assez abondant recouvre le fond du ballon. Au bout de 6 à 7 mois, une grande partie des bacilles se lyse et le milieu prend un aspect légèrement visqueux.

La même odeur de mimosa, quoique moins intense que chez le bacille Mb, se dégage des cultures de la souche Ca_2.

La souche Ca_1, enfin, a été isolée d'un autre produit de grattage de caoutchouc de robinet. Obtenue elle aussi par la méthode à l'acide sulfurique à 15 % sur milieu de Löwenstein, cette souche se distingue par le temps d'incubation extrêmement long qui lui est nécessaire pour atteindre son développement maximum. Ce temps dépasse largement celui qui est nécessaire aux bacilles tuberculeux en général. En frottis, la souche Ca_1 présente des bacilles fins et longs et toujours assemblés en grumeaux. Les éléments qui la constituent sont 100 % acido-résistants.

Ensemencée sur les milieux à l'œuf, cette souche donne, seulement au bout de 5 à 6 semaines, et bien longtemps après à la température de laboratoire, des colonies semi-sphériques très régulières, blanches, sèches et adhérentes au milieu; à la fin du développement de la culture, ces colonies fusionnent pour donner une pellicule à l'aspect très mamelonné et très sec. La souche Ca_1 se met très difficilement en suspension dans le sérum physiologique.

Sur le milieu à la pomme de terre glycérinée, cette souche présente exactement les mêmes caractères que sur le milieu à l'œuf. La culture est cependant un peu moins sèche. Elle pousse aussi lentement sur la gélose glycérinée, mais les cultures sont alors grasses et brillantes.

Enfin, sur le milieu de Sauton, elle donne pendant les 3 premières semaines, de toutes petites colonies rondes, isolées, ressemblant à des gouttelettes de paraffine solidifiées sur la surface du milieu. A la 5e ou à la 6e semaine, ces colonies se réunissent entre elles par un voile très mince, blanc, très friable, qui se déchire et tombe en petites plaquettes au fond du ballon. Le maximum de culture est atteint seulement après 20-25 semaines, et ne donne jamais plus de 5 gr. 700 à 6 gr. de bacilles secs par litre de milieu.

Un accident de laboratoire nous ayant privé de notre souche Truie, nous n'avons pu malheureusement étudier ses principaux caractères ainsi que nous l'avons fait pour les autres souches.

III. — Action sur les animaux de laboratoire

Il a été dit, dans l'introduction de ce travail, que les essais faits pour rendre les bacilles acido-résistants paratuberculeux, pathogènes pour les animaux à sang chaud, ont été infructueux. Certains auteurs qui avaient cru y réussir, ont dû la tuberculisation de leurs animaux d'expérience, à une contamination de leur souche avec un bacille tuberculeux vrai.

Nous avons nous-même tenté l'expérience, ou du moins nous avons voulu connaître qu'elle était l'action de nos souches sur les animaux usuels de laboratoire. Nous nous sommes servi de cobayes et de souris blanches.

Des suspensions assez fortes de chacune de nos souches, contenant environ 5 mgr. de bacilles par cc. d'eau physiologique étaient injectées, à raison de 1 cc. par animal, à 2 séries de cobayes ainsi qu'à 2 séries de souris. Une série de chaque espèce était inoculée sous la peau, l'autre dans le péritoine. Invariablement, après 3 ou 4 jours, il se formait chez les cobayes et les souris, inoculés sous la peau, un petit abcès qui grossissait pendant quelques jours pour atteindre parfois la grosseur d'une noisette, et qui en même temps devenait de plus en plus dur.

Cet abcès n'était jamais accompagné d'engorgement ou d'inflammation des ganglions régionaux. Au bout de 12 à 15 jours, il commençait à se ramollir, pour devenir de jour en jour plus petit, et finissait par se résorber complètement sans que l'on pût en retrouver trace au toucher; le tout durait de 20 à 25 jours

Des cobayes ou des souris sacrifiés 10 jours après l'inoculation présentaient à l'autopsie à l'endroit de l'inoculation,, un pus épais et crémeux, entouré d'une membrane de tissu fibreux, qui se révélait, à l'examen microscopique, constitué par de véritables amas de leucocytes, en grande partie abîmés et de bacilles acido-résistants : les uns extracellulaires, beaucoup d'autres dans le protoplasma des cellules, encore entiers, ou réduits déjà en une fine poussière de granulations acido-résistantes. Un examen sérieux de tous les organes, d'ailleurs d'apparence très saine, de l'animal sacrifié, ne pouvait révéler la présence d'aucun bacille acido-résistant.

Les animaux sacrifiés après la résorption complète de l'abcès ne présentaient plus de pus, et comme chez les premiers, nous n'avons

constaté aucune lésion de leurs organes, et pas davantage de bacilles acido-résistants dans les frottis de ces organes, à l'examen microscopique.

Il faut ajouter que dès l'apparition de l'abcès et jusqu'à sa résorption complète, les cobayes inoculés avec les diverses souches répondaient tous, les uns faiblement, les autres plus fortement, à l'injection intra-dermique de 0,2 cc. de tuberculine brute de Koch diluée au 1/10e. Cette sensibilité à la tuberculine disparaissait avec l'abcès.

Chez la deuxième série d'animaux, inoculés dans le péritoine, nous avons voulu voir, en même temps que les lésions pouvant être causées par les bacilles acido-résistants, pendant combien de temps après l'inoculation, on pouvait encore les retrouver dans le liquide péritonéal.

Pour ce faire, des prélèvements du liquide péritonéal étaient faits à la pipette effilée pendant les premiers jours après l'inoculation, sur les différents animaux. Ces prélèvements étaient étalés sur lame, fixés et colorés par la méthode de Ziehl-Nielsen.

Pendant les 3 ou 4 premiers jours on pouvait voir, à l'examen microscopique, un nombre très grand de leucocytes, parmi lesquels plusieurs étaient gorgés de bacilles; on pouvait également voir de nombreux bacilles acido-résistants libres dans le liquide péritonéal.

A partir du 4e jour, la quantité de bacilles commençait à diminuer pour devenir presque nulle au 8e jour, et enfin, les bacilles disparaissaient complètement à partir du neuvième.

D'autre part, ainsi que pour les animaux inoculés sous la peau, on ne remarquait à l'autopsie des animaux sacrifiés, aucune lésion des organes.

Inoculations au cobaye de bacilles acido-résistants, accompagnées d'inoculations périodiques d'extrait acétonique de bacilles de Koch. — Nous avons alors pensé aux artifices de préparation ou d'inoculation dont on se sert parfois pour exalter la virulence affaiblie d'une souche de bacilles tuberculeux, ou pour favoriser l'évolution des lésions des animaux inoculés récemment avec une souche pathogène.

L. Nègre et A. Boquet (1) ont montré que les substances cirograisseuses extraites des bacilles de Koch par l'acétone, injectées régulièrement par la voie sous-cutanée, deux fois par semaine, à des lapins ou à des cobayes qu'on vient de tuberculiser, favorisent l'évolution des lésions de ces animaux.

D'autre part, L. Nègre et Valtis (2) ont réussi à favoriser le développement des lésions tuberculeuses chez des cobayes préala-

blement inoculés avec les éléments filtrables de bacilles tuberculeux, dont on connaît le pouvoir peu pathogène pour le cobaye, en leur injectant par la voie sous-cutanée les mêmes extraits acétoniques.

Nègre, Valtis et Laroche (3) ont en outre isolé, d'une urine de malade atteint de néphrite hématurique de nature indéterminée, un bacille acido-résistant, peu pathogène pour le cobaye et rappelant le germe apparu dans les ganglions des cobayes inoculés avec le filtrat sur bougie Chamberland de bacilles tuberculeux; ce bacille a pu être isolé en inoculant des cobayes en deuxième passage, et en leur injectant en même temps l'extrait acétonique de bacilles de Koch.

Dans le même ordre d'idées, Nègre, Valtis et Van Deinse (4), en recherchant l'action des substances ciro-graisseuses du bacille de Koch sur les jeunes cobayes issus de mères tuberculeuses, ont constaté que ces animaux pouvaient développer des lésions ganglionnaires et des abcès contenant des bacilles de Koch, quand on les inoculait avec l'extrait acétonique pendant les deux ou trois mois après la naissance, à raison de 2 injections par semaine.

Enfin, L. Nègre, J. Valtis, F. Van Deinse et Beerens (5) ont montré que l'on peut mettre en évidence le virus tuberculeux contenu dans un produit pathologique suspect, et aussi dans le cas où l'ensemencement de ce produit sur les milieux à l'œuf et son inoculation au cobaye ont donné des résultats négatifs; il suffit pour cela, d'après ces auteurs, d'injecter aux cobayes, en même temps que le produit suspect, et d'une façon régulière pendant un certain temps, l'extrait acétonique du bacille de Koch.

Nous avons également eu recours à l'extrait acétonique du bacille de Koch que nous injections à des cobayes en même temps que des suspensions assez fortes de nos souches : ceci pour essayer d'exalter leur action pathogène, si toutefois elles en possédaient une qui fût inhibée ou affaiblie.

Nous avons préparé l'extrait acétonique comme suit :

Une culture de bacilles de Koch de 6 semaines est stérilisée à l'autoclave à 120°. On recueille les corps microbiens par centrifugation et on les lave 3 fois à l'eau distillée. Après dessication à l'étuve, on les reprend dans l'acétone — 100 cc. d'acétone pour 1 gr. de bacilles secs — en les introduisant dans un flacon à billes de verre; on laisse macérer pendant 48 heures en agitant de temps en temps. On filtre sur papier et l'on ajoute au filtrat une quantité égale d'eau distillée, on évapore à 45° jusqu'à réduction au volume initial.

Nous nous sommes servi de l'extrait ainsi préparé et des souches Mb, T_4 et Ca_1.

Chacune de 3 séries de 7 cobayes est inoculée avec une assez forte

suspension de chacune de ces trois souches. 5 cobayes de chaque série reçoivent en outre, en même temps que la suspension de bacilles, et du côté opposé, et ensuite régulièrement tous les deux jours, pendant 15-20 jours, 1 cc. d'extrait acétonique. Les 2 autres cobayes de chaque série servaient de témoins.

Tous les cobayes des 3 séries ont commencé à développer l'abcès local typique des bacilles acido-résistants paratuberculeux et l'abcès est allé en grossissant jusqu'au 10e-12e jour après l'inoculation. Cet abcès commençait alors à se résorber et les cobayes sacrifiés 16-20 jours après l'inoculation présentaient à l'autopsie des abcès extrêmement réduits, avec des traces de pus; les ganglions régionaux restaient toujours intacts. Les organes étaient tous normaux. Il n'y avait acune différence entre les cobayes inoculés avec l'extrait acétonique et les cobayes témoins.

Les substances ciro-graisseuses du bacille de Koch extraites par l'acétone semblent donc n'avoir aucune influence sur l'évolution des lésions causées par les bacilles acido-résistants paratuberculeux.

Inoculation de bacilles acido-résistants enrobés dans l'huile de paraffine. — L'étude du pouvoir pathogène des différentes souches de bacilles acido-résistants paratuberculeux remonte déjà à plusieurs décades, et un très grand nombre d'auteurs entreprirent des recherches dans ce sens. S'il fut prouvé que les bacilles paratuberculeux, quand ils sont inoculés en suspension dans l'eau physiologique, ne possèdent aucune action pathogène par eux-mêmes ou ne causent que des lésions minimes qui guérissent toujours sans laisser de traces et ne sont jamais transmissibles en série, les recherches déjà anciennes de L. Rabinowitsch (1897) (6), Pétri (1897) (7), Korn (8) et Tobler (9), Potet (1902) (10), Moeller (11), F. Bezançon et Philibert (1905) (12), avaient permis d'entrevoir qu'en injectant ces germes inoffensifs avec du beurre, on les rendait capables de créer à distance sur les poumons, des lésions nodulaires comparables aux lésions tuberculeuses et susceptibles d'entraîner la mort des animaux.

C'est à Pétri et à L. Rabinowitsch que revient la découverte de ce phénomène. Ces deux auteurs montrèrent, à peu près en même temps que le fait d'inoculer le germe, isolé par eux du beurre, dans le péritoine de cobayes en même temps que du beurre stérile, détermine chez ces animaux une péritonite à fausses membranes ayant un caractère nodulaire; inoculé sous la peau, il donnait, non seulement un abcès local, mais souvent des nodules pulmonaires.

Par la suite, de multiples observations furent faites par d'autres auteurs, et l'on est arrivé à se demander si l'action activante du beurre sur les lésions causées par les bacilles paratuberculeux appartenait aussi à d'autres corps gras. Tobler, entre autre, prouva que la graisse animale

avait la même action que le beurre stérile. Grassberger (13) fut le premier qui montra que des corps gras très variés, ayant des compositions chimiques très différentes, avaient une action identique quand on les inoculait avec les bacilles paratuberculeux. L'huile de paraffine, en particulier, pouvait déterminer la généralisation de l'infection, et produire des lésions graves dans les poumons.

Adoptant, en 1932, la technique de l'enrobage des bacilles dans l'huile de paraffine, employée déjà par H. Vallée, d'abord pour ses essais de vaccination anti-tuberculeuse des bovidés, puis, avec H. Carré et P. Rinjard (14), pour la prémunition des bovidés contre l'entérite hypertrophiante, W. A. Hagan et P. Levine (15) ont démontré que l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale au cobaye de bacilles acido-résistants saprophytes vivants, de bacille de Johne, de bacilles aviaires et de bacilles bovins tués, détermine le développement, dans les poumons, de tubercules caséeux et de vastes foyers nécrotiques : la mort peut même survenir en moins de quatre semaines, surtout quand l'inoculation est faite dans le péritoine. Les mêmes germes saprophytes vivants et les bacilles tuberculeux tués et mis en suspension dans l'eau physiologique, ne provoquent que de minimes lésions viscérales, même quand on les inocule à des doses massives et par voie veineuse.

Ces résultats furent confirmés et précisés par Noël Rist (16) en 1938 et par Saenz pour ce qui concerne les bacilles humains et bovins tués, enrobés dans la paraffine solide selon la méthode de E. Coulaud, ou mis en suspension dans l'huile de paraffine.

A. Saenz et G. Canetti (17) sont allés plus loin : ils ont observé le fait remarquable suivant : ayant inoculé à des lapins par voie intratesticulaire des bacilles d'origines différentes, tués, humains ou bovins, en suspension dans l'huile de paraffine, ils constatèrent que les lésions provoquées chez l'animal différaient suivant l'origine des bacilles, les différences étant tout à fait comparables à celles produites par l'inoculation des bacilles vivants correspondants; la réponse de l'animal à l'inoculation des bacilles humains et bovins, morts ou vivants, montrait, par sa spécificité, que l'action pathogène du bacille est due surtout à sa constitution chimique.

Reprenant l'étude de ces phénomènes en utilisant une souche de bacilles paratuberculeux isolée du pus d'un abcès froid chez un enfant, R. Laporte (18) a constaté que la présence de l'huile de paraffine au contact de bacilles paratuberculeux presque entièrement dénués de pouvoir pathogène entraîne, in vivo, la production de lésions très intenses susceptibles de réaliser un tableau anatomique de tuberculose caséeuse massive, et de tuer l'animal même si on utilise des bacilles tués. R. Laporte note qu'il n'est pas nécessaire d'inoculer l'huile et la culture mélangés. Le résultat est identique si on les injecte séparément par deux voies différentes : leur rencontre s'opère dans l'organisme, au niveau des poumons par exemple.

Les doses de corps gras auxquelles on incorpore les bacilles et que l'on injecte aux animaux d'expérience, ont une certaine influence sur

le développement des lésions. C'est ce qui ressort d'un travail exécuté par Th. Voiculescu (19) où elle inoculait le bacille de la fléole incorporé à doses variabes à du beurre stérile.

Th. Voiculescu en a tiré les conclusions suivantes : le bacille de la fléole, dit-elle, à la dose de 10 mgr., incorporé à doses variables à du beurre stérile et inoculé au cobaye par voie péritonéale, détermine une péritonite exsudative à fausses membranes accompagnée de nombreux nodules purulents. Les animaux meurent à partir du 5e jour. Il existe une relation étroite entre la quantité de beurre inoculée par voie péritonéale avec des bacilles de la fléole et la durée de la période d'incubation de la maladie. Plus la quantité de beurre inoculée est grande, plus la période d'incubation de la maladie est courte. En réduisant la quantité de beurre à 0,2 cc., elle prolongeait la période d'incubation du double, c'est-à-dire de 5 à 10 jours.

Nous avons également entrepris d'inoculer certaines de nos souches en les incorporant à de l'huile de paraffine et en les injectant par voies différentes : sous-cutanée et intrapéritonéale. Nous avons utilisé les souches Mb, Mj et T_4 et nous nous sommes servi de souris et de cobayes.

Inoculation aux souris de bacilles paratuberculeux et d'huile de paraffine, par la voie sous-cutanée. — Avec chacune des 3 souches employées, nous avons inoculé 4 lots de 4 souris chacun et de la façon suivante : le premier lot reçoit sous la peau une suspension de 1 à 5 mg. de bacilles vivants dans l'eau physiologique; le deuxième lot, une suspension de bacilles morts également dans l'eau physiologique; le troisième lot reçoit une suspension de bacilles vivants dans l'huile de paraffine stérile et enfin, le quatrième lot, une suspension de bacilles morts dans l'huile de paraffine.

Une souris de chaque lot et de chacune des souches était sacrifiée à partir de la première semaine qui suivait l'inoculation, et ensuite toutes les semaines. En aucun cas nous n'avons obtenu une diffusion des bacilles en dehors du point d'inoculation, ou des lésions métastatiques prouvant une action à distance dûe à l'association de l'huile de paraffine et des bacilles.

Les souris de tous les lots présentaient au bout de la première semaine un abcès sous la peau à l'endroit de l'inoculation.

A l'autopsie des souris ayant reçu la suspension des bacilles *dans l'eau physiologique*, on pouvait constater l'existence d'un pus abondant dans l'abcès, entouré d'une gaine de tissu fibreux. Tous les organes étaient normaux et il n'y avait pas d'engorgement ganglionnaire. A l'examen microscopique, aucun bacille acido-résistant dans les organes; par contre, dans le pus de l'abcès, très nombreux bacilles, libres ou à l'intérieur des leucocytes.

Chez les souris qui avaient reçu les suspensions *dans l'huile de paraffine*, l'abcès caractéristique était formé, au centre, d'une petite sphère d'huile de paraffine limpide, qui s'écoulait quand on crevait l'abcès; l'huile était entourée d'une couche de pus lié et le tout était recouvert d'une épaisse membrane de tissu fibreux. Les organes étaient indemnes; pas d'engorgement ganglionnaire et aucun bacille acido-résistant dans les organes à l'examen microscopique. Dans le pus de l'abcès, de nombreux bacilles avec, en même temps, une fine granulation acido-résistante, beaucoup plus abondante que dans l'eau physiologique, et dûe très vraisemblablement, à la désintégration des bacilles sous l'action de l'huile de paraffine.

Le même tableau anatomique se présentait les semaines suivantes, à cela près que les abcès s'ouvraient à l'extérieur entre la 1re et la 2e semaine, et formaient sur la peau des souris des plaies béantes au début, et entourées d'un bourrelet contenant du pus, et se résorbant petit à petit, pour guérir complètement vers la 4e ou la 5e semaine. A l'examen microscopique, les bacilles sont de moins en moins nombreux dans le pus de l'abcès et finissent par disparaître quand la résorption des plaies est complète.

Inoculation sous-cutanée aux cobayes de bacilles paratuberculeux enrobés dans de l'huile de paraffine. — R. Laporte avait obtenu des lésions macroscopiques intenses en inoculant aux cobayes son bacille P. enrobé dans l'huile de paraffine.

L'inoculation sous-cutanée aux souris ne nous ayant donné aucun résultat particulier, nous avons également eu recours aux cobayes.

L'expérience fut conduite de la façon suivante : les souches inoculées étaient toujours les souches Mb, Mj et T_4. Deux suspensions dans l'huile de paraffine étaient préparées avec chacune de ces souches : l'une avec des bacilles vivants et l'autre avec des bacilles tués à 100° pendant 30 minutes. Chacune des six suspensions ainsi faites, était inoculée à raison d'un centimètre cube par animal, à deux cobayes sous la peau de l'aine. Les cobayes étaient sacrifiés entre 58 et 65 jours après l'inoculation.

On commençait par obtenir, ainsi qu'avec les suspensions des mêmes bacilles dans l'eau physiologique, des abcès locaux : mais ces abcès se développaient beaucoup plus tôt et atteignaient une grosseur considérable. Déjà 4 à 5 jours après l'inoculation, ils s'étendaient sous la peau en « plaques » énormes, très épaisses et très dures, qui par la suite, grossissaient et durcissaient encore plus, et se maintenaient ainsi pendant les 25 à 30 premiers jours. Les abcès commençaient alors à se ramollir puis à se résorber, et chez

certains des cobayes, se divisaient en d'innombrables petits nodules purulents que l'on pouvait distinguer au toucher. Tel était l'état des abcès au 58e jour après l'inoculation, moment auquel nous avons commencé à sacrifier nos cobayes

Souche Mb : Les cobayes inoculés avec des bacilles tués, sacrifiés au 58e jour, présentaient à l'autopsie un abcès très ramolli, en résorption, contenant un pus abondant. Sous la peau, entourant le pus et les ganglions inguinaux, légèrement hypertrophiés, qui ne formaient qu'une masse, du tissu nécrosé de consistance fibreuse s'étendait jusque vers le milieu de l'abdomen et faisait fortement adhérer les muscles abdominaux à la peau. Les organes ne présentaient aucune lésion macroscopique. Les poumons paraissaient indemnes; cependant l'un des lobes portait quelques petites taches translucides.

A l'examen microscopique on retrouvait, dans le pus de l'abcès et dans les ganglions, avec de fines gouttelettes de paraffine, quelques bacilles acido-résistants, avec de nombreux débris de bacilles, ainsi que de très rares bacilles sur les frottis des poumons.

Chez les cobayes inoculés avec des bacilles Mb vivants, et sacrifiés le même jour, le pus de l'abcès était plus abondant et plus lié que chez les premiers. Les ganglions inguinaux étaient très durs et remplis de pus. La rate légèrement hypertrophiée, ne présentait aucune granulation apparente. Le foie était normal. Les poumons étaient recouverts d'assez gros et assez nombreux tubercules-abcès, contenant du pus, qui leur donnaient l'aspect de poumons tuberculeux. Les ganglions trachéo-bronchiques étaient hypertrophiés et durs.

A l'examen microscopique, de très nombreux bacilles acido-résistants dans le pus de l'abcès, dans les ganglions inguinaux et les tubercules pulmonaires. Pas de bacilles à l'intérieur du foie, de la rate et des ganglions trachéo-bronchiques.

Souche T_4 : Les cobayes inoculés avec cette souche furent sacrifiés au 62e jour. Ceux qui étaient inoculés avec des bacilles morts présentaient à l'autopsie, un chapelet de nodules purulents sous la peau dans la région de l'inoculation. Les ganglions inguinaux étaient hypertrophiés. Foie, rate, poumons, normaux. D'assez nombreux bacilles acido-résistants dans le pus des nodules et sur les frottis des ganglions inguinaux. Pas de bacilles sur les frottis des poumons.

Chez les cobayes inoculés avec les bacilles T_4 vivants, l'abcès, en regression, est remplacé par une gangue formée de nodules purulents, des ganglions inguinaux hypertrophiés, le tout enrobé dans du tissu nécrosé fibreux. Pus très abondant et crémeux dans

les nodules et les ganglions inguinaux des deux côtés. Foie et rate normaux. Foyers nécrosés et nombreux tubercules très fins sur les poumons.

A l'examen microscopique, on retrouvait de nombreux bacilles acido-résistants dans le pus des nodules, dans le pus des ganglions, et sur les frottis des poumons.

Souche Mj : Sacrifiés au 65e jour, les cobayes inoculés avec les bacilles morts de cette souche, présentaient sous la peau, à l'endroit de l'inoculation, un très gros abcès, légèrement ramolli. L'abcès était rempli de pus et entouré de tissu nécrosé. Les organes étaient normaux, et les poumons présentaient quelques petites granulations translucides. On retrouvait quelques bacilles dans le pus de l'abcès; pas de bacilles sur les frottis des poumons.

Chez les cobayes inoculés avec les bacilles T_4 vivants, même tableau anatomique que chez ceux inoculés avec les souches vivantes précédentes. On y retrouvait également des bacilles acido-résistants sur le frottis du pus des nodules, dans les ganglions inguinaux, et sur le frottis des tubercules pulmonaires.

Inoculations intrapéritonéales aux cobayes de bacilles paratuberculeux enrobés dans l'huile de paraffine. — En même temps que les inoculations sous-cutanées, et avec chacune des six suspensions précédemment employées, nous avons inoculé deux cobayes, à raison d'un centimètre cube par cobaye, dans le péritoine. En voici les résultats :

Souche Mb : Les cobayes inoculés avec les bacilles morts de cette souche sont sacrifiés 50 jours après l'inoculation. A l'autopsie ils présentent des ganglions inguinaux normaux, un épanchement péritonéal assez important, des fausses membranes en taches de bougies incrustées sur les 2 faces du foie. L'épiploon est nécrosé et très hypertrophié; il ne forme qu'un bloc avec le rein gauche et la rate, qui adhèrent fortement entre eux par un tissu fibreux de néo-formation. Le mésentère, également nécrosé, adhère au lobe droit du foie et au rein droit. Des chapelets de nodules longent le rebord pariétal du péritoine et les anses intestinales. Le diaphragme est épaissi et recouvert d'une forte membrane nécrotique. Les poumons paraissent normaux. Le magma de l'épiploon, de la rate et du rein gauche recèle un pus très abondant, avec de fines gouttelettes d'huile en suspension. On note la présence d'un épanchement pleural important contenant également des gouttelettes d'huile en suspension.

A l'examen microscopique, on retrouve des bacilles acido-résistants ainsi que des granulations acido-résistantes sur les frottis faits avec le mésentère, les nodules du péritoine, l'épiploon, et le

pus prélevé à l'intérieur de la masse formée par l'épiploon, la rate et le rein gauche. Absence de bacilles dans la rate et sur les frottis des poumons.

Les cobayes inoculés avec les bacilles Mb vivants meurent entre le 16e et le 20e jour après l'inoculation. A l'autopsie, on note le même tableau anatomique que chez les précédents, mais encore plus intense. Les ganglions inguinaux sont hypertrophiés et hémorrhagiques. Le foie est recouvert sur ses deux faces d'abondantes fausses membranes qui paraissent incrustées dans l'organe. L'épiploon est tuméfié et gorgé de pus caséeux. Il forme un bloc énorme comprenant la rate et le rein gauche, qui adhèrent d'ailleurs fortement à lui. Le magma ainsi formé laisse s'échapper à la pression, un pus abondant et caséeux. Le lobe droit du foie et le rein droit adhèrent fortement à la cavité péritonéale et sont enveloppés de tissu nécrosé rempli de pus. Le long des anses intestinales des chapelets de nodules purulents. Les intestins et leurs adhérences à la face dorsale de la cavité péritonéale constituent, le long de la colonne vertébrale, un canal rempli de pus. Le mésentère est également hypertrophié et purulent. L'épanchement pleural est assez abondant. Les poumons sont très congestionnés et recouverts par endroits de petites taches blanches. Des fausses membranes, pas très nombreuses, tapissent la plèvre et le péricarde.

A l'examen microscopique, on note de très nombreux acido-résistants un peu partout dans les organes et le pus. Très rares bacilles sur les frottis des poumons et du liquide pleural.

Souches T_4 et Mj : Les animaux inoculés avec les bacilles morts des souches T_4 et Mj, furent sacrifiés au 53e jour. Ils présentèrent, en général, les mêmes lésions que ceux inoculés avec la souche Mb. On pouvait cependant noter quelques différences dans l'intensité des lésions.

Les lésions du foie, du diaphragme, de l'épiploon et du mésentère étaient comparables les unes aux autres (avec les différentes souches tuées); avec le bacille T_4, ainsi qu'avec la souche Mb; aucune lésion apparente des poumons. Par contre, les poumons des cobayes inoculés avec la souche Mj étaient fortement nécrosés, adhérents au diaphragme d'une part, et aux parois de la cavité pleurale d'autre part, et ne formaient que deux grappes d'innombrables tubercules.

Avec la souche T_4, on retrouvait des bacilles acido-résistants dans les taches du foie, dans le pus de l'épiploon, dans la rate, le diaphragme et les nodules des anses intestinales; point de bacilles dans les poumons, le foie et le rein. Avec la souche Mj on retrou-

vait, en plus, de nombreux foyers avec d'innombrables bacilles dans les poumons.

Les cobayes inoculés avec des bacilles T_4 vivants, sont morts entre le 8e et le 11e jour. Ainsi qu'avec les bacilles Mb vivants, les lésions étaient plus intenses qu'avec les bacilles morts. Il en était de même avec les bacilles Mj vivants : les cobayes inoculés avec ce bacille furent sacrifiés au 40e jour, alors qu'ils étaient très cachectiques. En dehors du tableau classique rencontré avec les autres souches, ces cobayes présentaient, dans la cavité péritonéale, le long et à la même distance de la colonne vertébrale, des deux côtés, deux rangées symétriques de ganglions hypertrophiés, de la grosseur d'une petite noisette, nécrosés et de consistance cartilagineuse, et gorgés de pus. Les lésions obtenues avec la souche Mj étaient, en général, plus intenses que celles produites par les deux autres souches.

Discussion du phénomène réalisé par l'association des bacilles tuberculeux et l'huile de paraffine. — Il est intéressant de noter que des microorganismes presque entièrement dépourvus de pouvoir pathogène pour les animaux de laboratoire, provoquent des lésions tellement graves et deviennent capables de tuer l'animal quand on les inocule avec un corps gras. Par quel processus ces bacilles saprophytes acquièrent-ils ces propriétés et quelle est exactement l'action de l'huile de paraffine ?

Un fait évident est le suivant : les bacilles acido-résistants possèdent une affinité particulière pour les corps gras. S. et E. Mudd (20) ont montré que les bacilles acido-résistants en suspension dans l'eau physiologique, passent dans le corps gras quand on ajoute ce dernier, in vitro, à la suspension. Ceci a été également démontré par R. Laporte dans ses expériences de fixation par l'huile de paraffine et d'autres corps gras, des bacilles acido-résistants en circulation dans le sang ou dans la lymphe.

Il n'est donc pas étonnant que les bacilles paratuberculeux se localisent, dans l'organisme d'un animal, aux endroits contenant de l'huile de paraffine, et autour des fines gouttelettes d'huile que l'on trouve en suspension dans certains organes. D'autre part, parmi ces derniers, il en existe qui possèdent une affinité élective pour l'huile de paraffine : tels les poumons et les ganglions lymphatiques. Ce fait explique déjà les lésions à distance que l'on obtient sur les poumons quand on inocule les bacilles et l'huile soit ensemble, soit par des voies différentes.

De multiples raisons peuvent être invoquées pour expliquer l'action stimulante des corps gras sur le pouvoir pathogène des bacilles paratuberculeux.

On ne peut tout d'abord contester l'action activante de l'huile de paraffine sur la multiplication des bacilles dans les lésions. L'observation seule nous montre déjà que les paratuberculeux inoculés en suspension dans l'huile deviennent extrêmement plus abondants, et les abcès qu'ils forment beaucoup plus volumineux, que ceux provoqués par les mêmes germes en suspension dans l'eau physiologique. Et de plus, on les retrouve dans l'organisme pendant très longtemps quand ils sont inoculés avec huile, tandis qu'ils disparaissent relativement assez vite, avec résorption rapide de l'abcès, quand on les inocule en suspension aqueuse.

Même inoculés en très faibles quantités, avec l'huile, les bacilles paratuberculeux se multiplient abondamment, alors qu'en quantités égales dans l'eau physiologique, ils n'ont aucune action.

La présence d'huile dans les organes, en association avec des bacilles qui ne sont pas capables, en général, de s'y maintenir et se multiplier pendant longtemps, favorise leur développement, et leur prépare un terrain qui leur permet de végéter, et jusqu'à tuer l'animal en peu de temps.

R. Laporte (21) donne les raisons suivantes pour expliquer le mécanisme du rôle joué par les corps gras dans la pullulation, in vivo, des bacilles paratuberculeux.

« *a*) Le support huileux, dit-il, peut constituer un aliment pour les « germes; cela découle, en ce qui concerne les huiles minérales, du « rôle qu'elles remplissent in vitro dans le milieu synthétique de cul- « ture, mis au point par Söhngen, où elles constituent l'unique source « de carbone assurant le développement microbien.

« *b*) L'huile semble jouer en premier lieu un rôle de milieu d'échan- « ge au sujet de certaines substances nécessaires au métabolisme nor- « mal des bacilles. On connaît les exigences particulières en oxygène « de tous les bacilles acido-résistants, pathogènes ou non (Novy et « Soule, Webb, Boissevain et Ryder, Loebel, Schorr et Richardson). « La privation d'oxygène entraîne un arrêt immédiat du développement. « Or, les échanges gazeux s'effectuent parfaitement à travers une mince « couche d'huile. Il n'en est pas de même, selon toute probabilité, à « l'intérieur du cytoplasme des phagocytes. Les expériences de Loebel, « Schorr et Richardson sont en faveur d'un antagonisme entre les exi- « gences respiratoires des monocytes et celles des bacilles acido-résis- « tants, qui sont plus sensibles que les cellules aux effets de l'anaéro- « biose. Une accumulation de cellules inflammatoires paraît suffire pour « absorber tout l'oxygène utilisable par les microorganismes et cela « pourrait déterminer l'issue de la lutte entre eux et les éléments cel- « lulaires. Mais ce n'est pas aux seuls besoins respiratoires que se limi- « tent les exigences nutritives des bacilles paratuberculeux. Pour des « raisons qui nous échappent en grande partie, les acido-résistants sa- « prophytes témoignent d'une grande sensibilité aux effets de la pha-

« gocytose, soit en raison d'une action nocive directe, fermentaire ou « autre, des cellules inflammatoires à leur égard, soit plutôt par suite « d'une incompatibilité de leur métabolisme avec celui des éléments « réactionnels. La protection conférée par un enrobage huileux suffit « pour que d'un maintien normal du métabolisme bacillaire résulte une « multiplication active. »

Il est donc évident que l'huile confère aux bacilles paratuberculeux la propriété de pouvoir se développer au détriment de l'organisme. Mais l'action de l'huile ne se borne pas à faciliter la vie des bacilles vivants. Comment expliquerait-on alors les lésions produites par les bacilles morts ?

Est-ce réellement à une action pathogène propre au microorganisme, que l'on doit attribuer les lésions produites par les bacilles paratuberculeux enrobés dans l'huile de paraffine ? Ne serait-ce pas plutôt une action chimique dûe à certains produits libérés par l'huile du sein du bacille, et que l'eau physiologique est incapable de mettre en solution ?

On n'est pas encore tout à fait en mesure d'affirmer cette dernière interprétation. Mais on y est incliné par certaines expériences et par des faits déjà acquis.

On connaît le phénomène décrit par Ramsden : cet auteur note la formation d'une membrane de coagulation à la surface de séparation d'une huile ayant dissous de la lécithine, du cholestérol, de la cire d'abeille et portée au contact d'un liquide albumineux.

R. Laporte rapporte l'expérience suivante en faveur de cette hypothèse : des bacilles paratuberculeux ou tuberculeux morts et desséchés à l'étuve sont émulsionnés dans l'huile de paraffine; le mélange, placé à l'étuve à 37° pendant trois jours, est ensuite centrifugé, puis filtré à chaud sur bougie L2. L'huile filtrée claire a acquis la propriété de donner naissance, quand on la fait tomber goutte à goutte dans une sérosité organique, à une pseudo-membrane qui entoure les gouttes d'une gaine translucide. Lorsqu'on détruit cette membrane par agitation, elle se reforme aussitôt. De l'huile de paraffine pure ne donne rien de semblable, mais de l'huile ayant dissous des lipoïdes bacillaires extraits par l'alcool-éther ou par l'acétone se comporte comme celle dans laquelle on a fait macérer des corps microbiens.

D'autre part, en cherchant à comprendre le mécanisme par lequel l'huile de paraffine exalte le pouvoir pathogène des bacilles bovins morts, Mlle N. Choucroun (22) a été amenée à séparer des bacilles, par centrifugation prolongée, l'huile de paraffine dans laquelle elle les avait fait macérer. Elle a montré que cette huile extrait, par son contact prolongé avec les bacilles, un principe

actif sensibilisant les animaux sains à la tuberculine. Mlle N. Choucroun a en outre réussi à extraire de cette huile une substance chimique qui provoque, en l'absence de tout corps microbien, des lésions identiques à celles que produisaient les bacilles morts enrobés dans l'huile de paraffine.

Saenz avait déjà montré auparavant, dans les expériences où il inoculait le bacille bovin mort, que « la vie du bacille n'est pas l'essentiel dans l'action pathogène des bacilles tuberculeux ».

Tous ces faits ont permis à A. Boquet (23) d'entrevoir « que l'on pouvait espérer isoler les facteurs de la virulence au moyen de simples opérations physico-chimiques ».

Une autre preuve qui vient encore à l'appui de l'action chimique d'une substance extraite par l'huile des bacilles tuberculeux ou paratuberculeux, est la suivante : les lésions produites par ces bacilles chez le cobaye quand on les inocule, vivants ou tués, avec de l'huile de paraffine, ne leur sont pas purement spécifiques. Nous avons obtenu, avec le Dr Burnet, exactement les mêmes lésions en employant la méthode d'inoculation du bacille de la lèpre des rats (bac. de Stéphansky) également enrobé dans l'huile de paraffine. Des inoculations d'une suspension de bacilles de Stéphansky, tués ou vivants, dans l'huile de paraffine, à des cobayes, par les voies sous-cutanée, intrapéritonéale ou intratesticulaire, produisent en un laps de temps relativement court, des lésions identiques et en tout comparables à celles produites par les bacilles tuberculeux et les bacilles paratuberculeux. On obtient la même pullulation de germes, avec les bacilles vivants, les mêmes lésions viscérales, et souvent même des tubercules sur les poumons, avec les bacilles tués ou vivants.

Le bacille de Stéphansky, à l'expansion duquel le cobaye est tout à fait réfractaire, ne doit très certainement son action sur cet animal, qu'à la libération produite, sous l'effet de l'huile de paraffine, d'une substance de nature très probablement lipoïdique, comparable à celle extraite des bacilles tuberculeux ou paratuberculeux.

On peut encore supposer, ainsi que l'a déjà fait R. Laporte, et en plus de raisons déjà citées, que l'action de l'huile sur les lésions causées par les bacilles paratuberculeux, s'effectue grâce à la lenteur de résorption des corps gras dans les tissus in vivo. En effet, les bacilles qui, comme nous l'avons dit, ont une affinité pour l'huile, et qui se trouvent recouverts d'une couche assez épaisse de matière grasse, doivent profiter grâce à cet enrobage, de la difficulté avec laquelle les tissus résorbent l'huile et par ce fait, la désintégration des bacilles dûe aux tissus, doit être beaucoup plus

lente que celle exercée sur les bacilles inoculés en suspension aqueuse.

Pour cette même raison, les bacilles doivent jouir d'une certaine immunité contre les macrophages. Les gouttelettes d'huile au sein desquelles les bacilles se trouvent enfouis, doivent gêner les phagocytes dans leur action.

Il faut enfin tenir compte de l'action propre de l'huile de paraffine et des corps gras en général. Ce n'est pas que ces derniers possèdent un pouvoir toxique par eux-mêmes. N. Rist a bien montré que les lésions provoquées par une injection d'huile de paraffine pure, ne présentent aucune gravité. Cependant il faut leur reconnaître une certaine action irrante qui persiste sur les tissus, capable d'accentuer les lésions causées par les bacilles paratuberculeux, et leur facilitant ainsi leur tâche.

D'ailleurs on a pu reproduire, dans une certaine mesure, le renforcement du pouvoir pathogène des bacilles paratuberculeux, en employant des substances autres que des corps gras. Ces substances, telles que la poudre de lycopode, le kaolin et le poivre, n'agissaient que par leur action irritante.

En résumé, aucune des raisons indiquées ici ne suffit à elle seule pour expliquer les lésions très graves et souvent mortelles causées par les bacilles paratuberculeux, par eux-mêmes inoffensifs, quand ils sont inoculés en même temps qu'un corps gras.

C'est plutôt grâce à l'ensemble de ces diverses actions associées que l'huile de paraffine, ainsi que les autres corps gras qui ont donné des résultats comparables, suscite ou stimule une action pathogène des bacilles paratuberculeux.

IV. - Essai d'étude physico-chimique

L'étude physico-chimique de nos souches a porté sur l'évolution des cultures en milieu liquide de Sauton, et sur les changements que les souches font subir à ce milieu : variations du pH, recherche de l'apparition de la réaction xanthoprotéique. Nous avons procédé en outre au dosage de la teneur en matières protéiques et en matières grasses des diverses souches.

Nous avons pu ainsi distinguer trois formes de variations de la réaction, correspondant à trois formes différentes d'évolution, et établir des graphiques représentatifs de ces formes. Il nous a été également permis de dresser des comparaisons entre nos bacilles et les bacilles tuberculeux, au point de vue de leur teneur en protéides et en lipides, d'après les données de nos dosages et celles déjà acquises sur les tuberculeux vrais.

Technique employée. — Avec chacune de nos souches nous avons ensemencé une série de ballons contenant chacun 200 cc. du milieu de Sauton. Le pH du milieu, lors de sa préparation, était porté à 7,3; après stérilisation à l'autoclave, le pH du milieu de Sauton tombait invariablement à 7,1, cette chute étant très certainement due à l'évaporation d'une certaine quantité du liquide. Les ballons étaient d'ailleurs pesés avant et après leur passage à l'autoclave, et nous avons constaté une moyenne d'évaporation de 10 gr. sur les 200 cc., ce qui fait une perte de 5 % environ sur les 205 gr. de milieu.

Les ballons étaient placés à l'étuve à 37°, et toutes les semaines, à partir de la première, nous en prenions un de chaque série que nous filtrions sur papier taré.

Poids des bacilles secs. — Le filtre et les bacilles obtenus étaient séchés à 50° pendant 24 heures et pesés. Nous rapportions ensuite au litre le poids de bacilles secs récoltés sur 200 cc. de milieu. Le tableau I donne une figure assez nette de l'évolution des cultures en fonction du poids des bacilles secs.

En général, les cultures de nos souches atteignaient rapidement un maximum entre la 3e et la 5e semaine. Le poids des bacilles récoltés commençait alors à diminuer, et cette diminution était due à la lyse d'une certaine quantité de bacilles dans le milieu. Tel fut le cas pour les souches T_1, T_2, Mb et Mj. Pour d'autres souches, le poids des bacilles recueillis sur le filtre augmentait pendant très longtemps : l'autolyse ne survenait alors qu'au bout d'un temps très long. Tel est le cas de la souche Ca_2, où les bacilles ne commencent à se lyser en partie qu'au bout de 6 à 7 mois de culture. Quant aux souches Ca_1 et T_3, on peut dire que chez elles la lyse est pratiquement nulle. Aussi le poids des bacilles récoltés de leurs cultures augmente-t-il continuellement.

Les bacilles secs, recueillis de chacune des souches, étaient conservés et nous servaient pour les dosages de l'azote total et des matières grasses.

TABLEAU N° 1

Evolution des cultures en fonction du temps en semaines et du poids des bacilles secs en grammes.

Temps en semaines	T_1		T_2		T_3		T_4		Mb		Mj		Ca_2		Ca_1	
	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre	200cc	litre
1	—		0.238	1.190			—		1.895	9.475		—	0.358	1.790	—	—
2	0.447	2.235	0.320	1.600	0.223	1.115	0.503	2.515	2.459	12.295	0.798	3.990	0.679	3.350	—	—
3	1.181	5.905	1.005	5.025	0.260	1.300	0.710	3.550	2.533	12.915	2.717	13.585	1.360	6.800	—	—
4	1.294	6.470	0.965	4.845	0.260	1.300	0.628	3.140	2.558	12.790	2.905	14.525	2.515	12.575	0.405	2.025
5	1.465	7.325	0.902	4.510	0.245	1.225	0.752	3.760	2.650	13.250	2.935	14.675	2.528	12.640	—	
6	1.045	5.225	0.825	4.125	0.290	1.450	—	—	2.634	13.170	2.500	12.500	3.020	15.120	0.450	2.250
7	1.395	6.975	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.788	13.940	0.637	3.185
8	1.038	5.190	—	—	0.323	1.615	1.010	5.050	—	—	—	—	—	—	0.990	4.950
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.270	11.350	—	—	1.005	5.025
10	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.100	5.500
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.285	16.425	—	—
15	—	—	1.243	6.225	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.135	5.675
23	—	—	—	—	—	—	2.128	10.640	—	—	—	—	—	—	—	—
33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.548	7.740

Sur les filtrats, nous procédions à la recherche de la réaction xanthoprotéique, selon la technique de R. Lefaux. Un tableau résumant les résultats est donné dans la partie de ce travail réservée à la recherche du pouvoir tuberculinique. Une partie du filtrat était alors prélevée et chauffée à 100° pendant 30 minutes; elle nous servait ensuite à inoculer des cobayes tuberculeux dans le derme pour la recherche du pouvoir tuberculinique.

Mesure du pH. — Sur les filtrats de toutes les semaines nous faisions également la mesure du pH. Ce qui nous a permis de dresser le tableau n° 2.

Il est vrai qu'en dehors du développement des bacilles dans le milieu un autre facteur important pouvait intervenir dans les variations du pH : l'évaporation progressive qui avait lieu à l'étuve. Mais toutes les cultures de toutes les souches étant faites dans les mêmes conditions et l'évaporation étant la même dans tous les ballons, les valeurs que nous avons obtenues gardent toute leur valeur à titre comparatif.

Il ressort d'autre part du tableau n° 2 que les variations du pH dues à l'évaporation ne doivent pas être très grandes, puisque la même valeur était obtenue à la fin de l'évolution d'une culture, pour la même souche, pendant plusieurs semaines successives.

Le tableau n° 2 nous indique nettement les 3 formes différentes d'évolution des cultures de nos 8 souches.

TABLEAU N° 2

Variations du pH dues à l'évolution des cultures.

Temps en semaines	T_2	T_3	T_4	Mb	T_1	Ca_1	Mj	Ca_2
1	6,7	6,7	6,7	6	7,1	7,1	—	7,9
2	5,5	5,9	5,5	5,4	7,1	7,1	7,8	6,5
3	5,5	5,3	5,3	5,2	6,8	7,0	7,9	5,9
4	5,5	5,3	5,3	4,7	6,0	6,9	7,0	5,5
5	5,5	5,2	5,2	4,4	5,5	6,7	6,7	5,5
6	5,5	5,1	5,2	4,2	5,5	5,9	6,7	5,3
7	5,5	5,1	5,1	4,2	5,5	5,5	6,7	5,1
8	—	5,1	4,9	—	5,5	4,6	6,7	—
9	—	—	—	—	—	4,6	—	—
10	—	—	—	—	—	4,5	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—	4,5
15	—	—	—	—	—	4,3	—	—
22	—	—	4,6	—	—	—	—	—

Tandis que les souches T_2, T_3, T_4 et Mb font directement passer le pH du milieu sur lequel elles se développent, de 7,1 à l'acidité dès la 1re semaine, les souches T_1 et Ca_1 restent jusqu'à la 3e semaine dans la zone neutre de 7,1 pour ne tomber qu'alors et passer lentement à l'acidité. Avec les souches Mj et Ca_2, le pH passe d'abord de 7,1 à l'alcalinité jusqu'à 7,9, et ne devient acide qu'ensuite ou même s'arrête dans l'acidité non loin de la zone neutre.

En 1904, Théobald Smith (1) décrit une méthode biochimique pour la différenciation entre les bacilles tuberculeux des types humain et bovin. Quand on cultive ces bacilles sur bouillon glycériné, le type humain donne une réaction ultime acide, tandis que le type bovin produit une réaction neutre, légèrement alcaline ou légèrement acide. La réaction acide du type humain, dit-il plus tard, provient de son pouvoir de convertir la glycérine en acide, tandis que le type bovin emploie la glycérine sans la changer en acide.

Bang (2), Mohler et Washburn, et d'autres, ont confirmé après lui la différence qui existe entre les courbes de réactions des types humain et bovin. Fibiger et Jensen (4), cependant, ainsi que Griffith (5), concluent qu'elle n'est pas suffisamment constante pour lui attribuer une grande valeur dans la différenciation des 2 types. Grund (6) pense qu'en général la courbe de la réaction sur bouillon glycériné divise les bacilles tuberculeux en 2 groupes correspondant aux 2 types de mammifères mais que le nombre de réactions irrégulières et réversibles limite sa valeur.

J. D. Aronson (7), en 1930, étudie la courbe de réaction de 216 souches, dans les mêmes conditions. Les résultats de son étude sont en accord avec ceux de Théobald Smith et les autres auteurs. Le groupe de bacilles du type humain change d'abord l'acidité originelle du milieu en une réaction alcaline et ensuite en une réaction acide dépassant de beaucoup l'acidité du milieu stérile. L'autre groupe change aussi la réaction d'abord en une réaction alcaline, mais cette dernière réaction se maintient par la suite, et ne revient plus à l'acidité.

D'autre part, J. Bance (8) a pu établir un procédé de diagnose des 3 types de bacilles tuberculeux ainsi que du B.C.G., en considérant les modifications de réaction qu'ils font subir au milieu de Sauton. Pour le B.C.G., le bacille bovin et le bacille humain, le pH commence à croître vers un maximum (7,5) qu'il atteint le 14e jour, puis décroît régulièrement. Il y a donc d'abord alcalinisation, puis acidification. Pour le bacille aviaire, le pH décroît directement sans passer par un maximum. Il y a donc chez lui acidification directe sans alcalinisation préalable.

De même que ces auteurs pour les bacilles tuberculeux vrais, il nous semble que ce moyen de différenciation de 3 formes de courbes de réaction du milieu, pourrait servir dans l'étude des bacilles paratuberculeux pour une classification qui soit basée sur des données mesurables. Nous n'avions malheureusement pas à notre disposition un nombre élevé de bacilles paratuberculeux

mais il serait intéressant de voir dans ce grand groupe, le nombre d'individus qui pourront être classés dans chacune des 3 formes que nous avons trouvées pour les 8 souches isolées par nous.

Les graphiques des figures I, II, III donnent une idée assez précise des variations de réaction de chacune de nos souches.

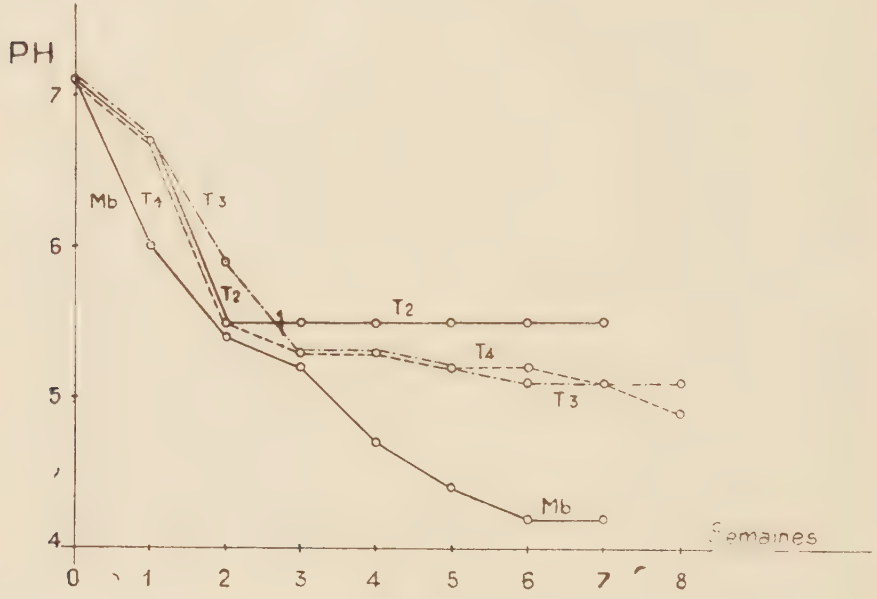

FIG. 1

Courbes des variations du pH du milieu de Sauton (souches T2, T3, T4 et Mb)

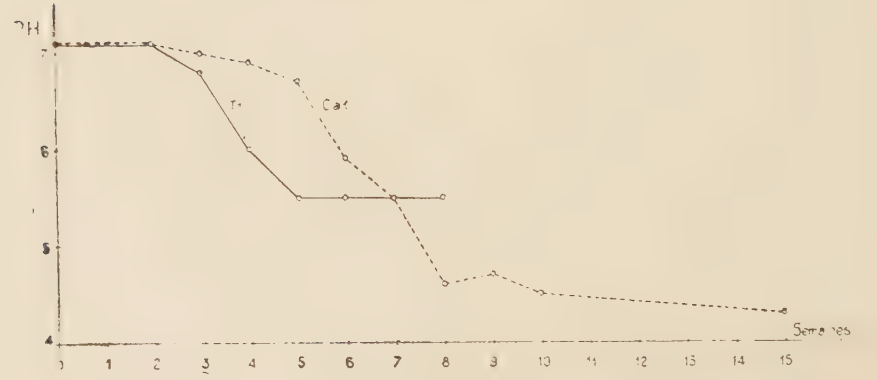

FIG. 2

Courbes des variations du pH du milieu de Sauton (souches T1 et Ca1)

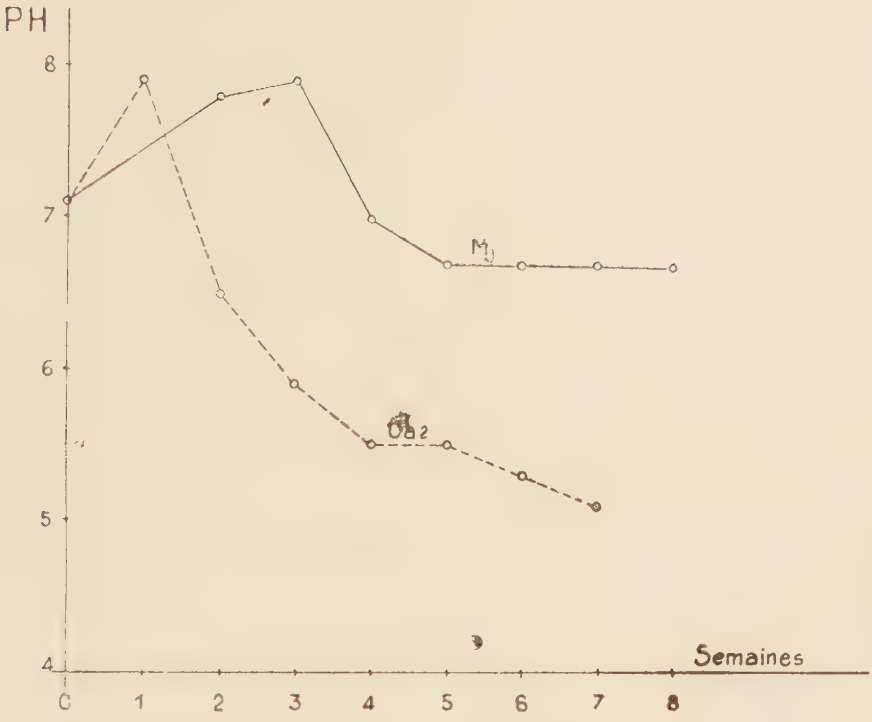

FIG. 3

Courbes des variations du pH du milieu de Sauton (souches Mj et Ca2)

Dosage des matières protéiques et des matières grasses. — Pour les dosages des matières protéiques et des matières grasses, nous avons employé les récoltes de bacilles secs obtenus par la culture de nos souches sur le milieu de Sauton. Les récoltes de chaque semaine de chaque souche étaient réunies et mélangées; ceci pour obtenir une valeur moyenne du taux d'azote et des corps gras. On sait, en effet, que la teneur des bacilles en ces substances n'est pas la même pour les cultures d'âges différents.

Azote total. — Le dosage de l'azote total a été fait par voie humide selon la méthode de Kjeldahl et avec l'appareil d'Aubin.

Les composés azotés des bacilles étaient détruits au moyen de l'acide sulfurique et du sulfate de potassium comme agent réducteur. Pour que la totalité de l'azote soit hydrogénée à l'état d'ammoniaque, nous prolongions l'attaque, après décoloration, de 1 heure 1/2 à 2 heures.

Le poids de la prise d'essai était de 500 mg. de bacilles secs. Le titrage de l'ammoniaque était effectué avec une solution d'acide sulfurique déci-normale, le rouge de méthyle en solution alcoolique de 50° à 1/5.000 servant d'indicateur.

Nous avons pu ainsi déterminer la teneur en azote total de 7 de nos souches, la 8e (souche T_3) n'ayant pas fourni, ainsi qu'il ressort du tableau n° 1, suffisamment de bacilles pour pouvoir en faire le dosage.

Le tableau n° 3 donne les proportions d'azote total rapportées à 100 gr. de bacilles secs pour les 7 souches.

Multipliées par le facteur protéique 6,25, ces valeurs nous ont donné la teneur moyenne en matières protéiques des différentes souches. Le tableau n° 3 en donne également les résultats.

TABLEAU N° 3

Teneur des souches en Azote total et en matières protéiques.

Souches	T_1	T_2	T_4	Mb	Mj	Ca_2	Ca_1
N total pour 100 gr. de bacilles secs ..	8,871	7,250	6.906	7.891	7,143	6.955	6,300
Matières protéiques pour 100 gr. de bacilles secs	55.443	44.312	43.162	49.318	44.643	43.468	39.375

Darzine (9), faisant aussi le dosage de l'azote total de bacilles paratuberculeux par la méthode de Kjeldahl, a trouvé le pourcentage suivant :

8,47 % pour le bacille de Grassberger et 8,96 % pour le bacille de Moeller.

D'après Kresling (10), le bacille tuberculeux contient 8,58 % d'azote total.

Les valeurs données dans le tableau n° 3, ainsi que celles trouvées par Darzine, montrent que la quantité d'azote total fournie par ces bacilles et par celui de la tuberculose est sensiblement la même, la souche Ca_1 seule ayant donné une valeur nettement inférieure.

Matières grasses totales. — D'après E. Long et Campbell, la teneur en substances lipoïdiques serait de 4 à 10 % pour le bacille du smegma et le bacille de l'herbe (Timothée), contre 27 à 28 % pour le bacille de la grenouille. Chargaff, Pangborn et Anderson (11) ont également établi que le bacille de la tléole contient

moins de lipides que les bacilles tuberculeux, mais ces lipides ont la même composition chez ces diverses espèces.

Darzine a trouvé 17,4 % de matières grasses solubles dans le chloroforme pour le bacille de Grassberger et 23,78 % pour le bacille de Moëller.

Hammerschlag (12) et Weyl (13) avaient trouvé pour le bacille tuberculeux que la quantité de matières grasses représentait 27 % du poids sec. C'est également le taux donné par Ruppel (14) et par Aronson avec certaines cultures. D'autres auteurs indiquent une proportion plus élevée : 31 à 32 % (Levène) (15); 33 à 34 % (Auclair et Paris (16); Allilaire et Fernbach) (17); 39 % (Kresling); 40 % (Bulloch et Mac Leod) (18), etc...

Ces différences peuvent provenir de l'origine des bacilles analysés : ainsi de Schweinitz et Dorset (19) ont constaté que les bacilles d'origine humaine cèdent à l'éther un taux de matières grasses plus élevé (28,77 %) que les bacilles des types bovin, équin et surtout porcin; par contre, la variété humaine donnerait le poids d'extrait alcoolique le plus bas.

Mais les différences peuvent aussi être dûes, du moins pour une grande part, à la nature des solvants et aux procédés d'extraction utilisés. En effet, les bacilles étaient soumis par les différents auteurs, tantôt à l'action d'un seul parmi les divers solvants des graisses, tantôt de plusieurs d'entre eux employés successivement, et l'extraction était faite tantôt à froid, tantôt à chaud soit par digestion ou ébullition, soit par des épuisements dans des appareils du genre Soxhlet. D'une façon générale la masse bacillaire n'était pas pulvérisée.

Aussi avons-nous employé pour faire les dosages des matières grasses, la méthode préconisée et décrite par E. Lobstein (20) pour l'extraction des matières grasses totales du bacille tuberculeux.

La masse de bacilles secs obtenus sur le filtre est tout d'abord broyée dans un mortier et réduite en une poudre fine. Cette poudre est ensuite épuisée dans un appareil Soxhlet et les épuisements sont faits sous pression réduite, de façon que la température à l'intérieur de l'appareil ne dépasse jamais 50°.

Comme solvants nous avons employé successivement l'alcool à 95° et l'éther. L'action solvante de ce dernier est facilitée par l'alcool qui libère les graisses et les lipoïdes de leurs complexes avec les albuminoïdes : c'est du reste sur ce principe que sont basées la méthode d'Adam pour le dosage du beurre dans le lait et le procédé colorimétrique de Grigaut pour le dosage de la cholestérine dans le sérum et les tissus. On complète l'épuisement par

le chloroforme, car ce dernier solvant enlève des substances qui ne se dissolvent pas dans l'éther.

Chaque solvant agit environ 20 heures. De cette façon, on est presque sûr que la totalité des matières grasses et des lipoïdes est extraite, et les résultats obtenus pour les diverses souches sont comparables et nettement suffisants.

On obtient finalement les matières grasses en évaporant les solvants dans des capsules tarées, et l'on réunit par fusion les extraits des différents solvants.

Sur cet extrait total, nous avons fait ensuite le dosage des acides gras libres par la méthode acidimétrique : une prise d'essai de 0,50 gr. à 1 gr. de l'extrait homogène est dissoute dans 50 cc. d'alcool à 95°. On dose à la soude N/10, et on emploie le phénolphtaléine comme indicateur. L'on cherche ensuite l'indice d'acidité en se servant de la formule $\frac{n}{p} \times 5{,}6$ (n étant le nombre de centi-cubes de soude N/10 écoulés et p le poids en grammes de la prise d'essai). On peut l'exprimer en acide oléique sachant que 1 cc. de soude N/10 neutralise 0,0282 de cet acide.

Nous donnons ci-dessous, parallèlement, un tableau indiquant la teneur en matières grasses du bacille tuberculeux, telle que l'a trouvé Lobstein (tableau n° 4), et un second tableau montrant la richesse en matières grasses de nos souches T_1, T_2, Mb, Mj, Ca_2 et Ca_1). (Les souches T_3 et T_4 ne nous ont pas donné suffisamment de bacilles secs pour faire le dosage des matières grasses). (Tableau n° 5).

TABLEAU N° 4

Teneur des bacilles tuberculeux en matieres grasses d'après Lobstein

	Souche A	Souche B
Poids des bacilles secs soumis à l'épuis	2,336 gr.	0,786 gr.
Poids de l'extrait ... alcoolique	0,206	0,170
Poids de l'extrait ... éthéré	0,560	0,640
Poids de l'extrait ... chloroformique ..	0,130	0,133
total		
Poids de l'extrait total pour 100 gr. de bacilles secs	38,7	36,6
ACIDES GRAS LIBRES		
Prise d'essai	0,810 gr.	0,786 gr.
Na OH N/10 nécessaire pour neutralisation	4,95 cc.	5 cc.
Acides gras libres en acide oléique .... dans la prise	0,139 gr.	0,141 gr.
Acides gras libres en acide oléique .... pour 100 gr. d'extrait	17,16	17,93
Indice d'acidité	34	35,6

TABLEAU N° 5

Matières grasses totales de diverses souches de paratuberculeux.

	Souche T_1	Souche T_2	Souche Mb	Souche Mj	Souche Ca_2	Souche Ca_1
Poids de bacilles secs soumis à l'épuisement	2,119 gr.	2,145 gr.	2,500 gr.	2,045 gr.	2,500 gr.	1,855 gr.
Poids de l'extrait alcoolique	0,198	0,322	0,471	0,447	0,532	0,287
Poids de l'extrait éthéré	0,091	0,075	0,302	0,193	0,133	0,238
Poids de l'extrait chloroformique	0,059	0,052	0,078	0,140	0,074	0,046
Poids de l'extrait total	0,349	0,449	0,851	0,780	0,739	0,571
Poids de l'extrait total pour 100 gr. de bacilles secs	16,41	20,92	34,04	38,12	29,56	30,77

ACIDES GRAS LIBRES

Prise d'essai	0,348	0,447	0,851	0,582	0,711	0,564
Na OH N/10 nécessaire pour neutralisation	3,3 cc.	3,6 cc.	5,5 cc.	3,5 cc.	6,3 cc.	4,4 cc.
Acides gras libres en acide oléique dans la prise d'essai	0,093	0,1015	0,155	0,0987	0,177	0,124
Acides gras libres en acide oléique pour 100 grammes d'extrait	26,72	22,71	18,2	16,95	24,89	22,00
Indice d'acidité	53,09	45,08	34,2	33,666	49,6	43,68

Il ressort des tableaux 4 et 5 que la teneur en matières grasses des bacilles acido-résistants saprophytes isolés par nous est comparable pour plusieurs souches (Mb, Mj, Ca_2 et Ca_7 à celle des bacilles tuberculeux. Les souches T_1 et T_2 possèdent un taux de matières grasses nettement inférieur.

D'autre part, on constate aisément que, contrairement aux bacilles tuberculeux humains qui cèdent la plus grande partie de leurs substances grasses à l'éther et très peu à l'alcool, nos souches cèdent à l'alcool la plus grande partie de leurs matières grasses, et une beaucoup moindre quantité à l'éther. Ce caractère les rapprocherait des bacilles tuberculeux des types bovin, équin et porcin, dont il a été fait mention plus haut.

Quant à la teneur en acides gras libres des extraits totaux de matières grasses, elle est en général supérieure chez nos souches à celle trouvée par Lobstein pour les bacilles tuberculeux.

Il serait enfin intéressant de rapporter ici une expérience que nous avons entrepris avec la souche Mb.

Nous avons préparé une série de fioles d'Erlenmeyer contenant chacune 75 cc. de milieu de Sauton : deux des fioles contenaient du Sauton ordinaire, tandis que dans le reste des fioles, le milieu était, tour à tour, privé de l'un de ses constituants. Avec chacune des solutions suivantes : sans acide citrique, sans phosphate bipotassique, sans sulfate de magnésium et sans citrate de fer ammoniacal, nous avons rempli deux fioles. Avec les solutions privées de glycérine et privées d'asparagine, nous avons rempli 4 fioles au lieu de 2.

Nous avons pu ainsi obtenir des renseignements sur la nécessité qui s'impose à la souche Mb vis-à-vis de certaines substances.

Le pH était corrigé à l'aide de l'ammoniaque et porté à 7,3, lors de la préparation des solutions, dans une seule des deux fioles remplies avec le Sauton ordinaire et les premières solutions, et dans deux des 4 fioles remplies avec les deux dernières solutions. Dans le reste des fioles, le pH était maintenu tel quel. Après stérilisation le pH était égal à 7,1 dans les fioles à pH corrigé, et le suivant dans les différentes autres fioles : 2,6 (milieu sans asparagine), 4,9 (milieu sans acide citrique), et 2,9 pour toutes les autres solutions.

L'asparagine et la glycérine étant deux corps nécessaires au bon développement des bacilles acido-résistants, nous ajoutions dans les fioles qui en étaient privées (une au pH corrigé et l'autre au pH non corrigé), de la paraffine solide que nous laissions tomber en gouttes d'une pipette effilée et chauffée pour liquéfier la paraffine. Comme on le sait, la paraffine est un hydrocarbure élevé dont les

TABLEAU N° 6

Nature de la solution	pH avant culture	pH après culture	Poids des bacilles secs; aspect de la culture	Poids des bac./litre	Taux de l'azote total
Sauton ordinaire	7,1	4,2	1,008	13,440	7,924
— —	2,9	2,8	Trouble léger	—	—
Sans asparagine	7,1	4,5	0,513	6,84	—
— —	2,6	2,7	Pas de culture	—	—
— — + paraffine	7,1	4,4	0,535	7,133	—
— — —	2,6	2,7	Pas de culture	—	—
Sans glycérine	7,1	7,1	Trouble léger	—	—
— —	2,9	2,8	— —	—	—
— — + paraffine	7,1	8,3	0,112	1,493	
— — —	2,9	2,8	Trouble léger	-	
Sans acide citrique	7,1	6,4	1,045	13,933	6,496
— — —	4,9	5,9	1,043	13,906	5,152
Sans PO_4K_2H	7,1	6,9	Trouble léger	—	—
— —	2,9	2,8	Pas de culture	—	—
Sans sulfate de magnésie	7,1	8,1	0,480	6,400	—
— — —	2,9	2,8	Trouble léger	—	—
Sans citrate de fer ammoniac	7,1	6,4	0,443	5,906	—
— — — —	2,9	2,8	Trouble léger	—	—

bacilles acido-résistants paratuberculeux peuvent se servir comme source de carbone.

Les fioles étaient alors ensemencées avec la souche Mb et laissées à l'étuve pendant 4 semaines. Au bout de ce temps, nous avons filtré les cultures sur papier taré, séché les bacilles et pesé.

Nous avons obtenu les résultats suivants (tableau n° 6) :

Il ressort du tableau n° 6, que la souche Mb ne pousse pas du tout en pH acide inférieur à 4,9, ou trouble très légèrement le liquide, même en milieu de Sauton complet. Sur milieu de Sauton au pH = 7,1, la souche a poussé normalement. La glycérine semble être indispensable au développement de la souche Mb : il n'y a eu qu'un très léger trouble dans la solution privée de glycérine, à pH = 7,1; et même en remplaçant cet hydrocarbure par la paraffine, nous n'avons obtenu que 1,493 gr. de bacilles secs pour un litre de solution.

La souche Mb doit être très sensible aux variations du pH, puisque la solution non tamponnée au phosphate bipotassique, et portée quand même à pH = 7,1 n'a donné acune culture.

Le magnésium et le fer sont aussi deux éléments nécessaires à un bon développement de la souche : les solutions privées de SO_4Mg et de citrate de fer ammoniacal ont donné une culture pauvre, n'atteignant pas la moitié de la culture en milieu normal.

Quant à l'acide citrique, son absence ne gène en rien le développement normal du bacille Mb, aussi bien à pH = 7,1, qu'à pH = 4,9. Au contraire, le poids des cultures obtenues sur cette solution, et aux deux pH différents, est plus grand que celui de la culture en milieu de Sauton normal. Mais fait curieux, le taux d'azote de ces cultures est inférieur à celui des cultures obtenues sur Sauton ordinaire : la culture obtenue sur solution privée d'acide citrique et à pH corrigé a donné le taux de 6,496 et celle à pH non corrigé 5,152. Cette différence provient très probablement de ce que le pH a été corrigé à l'aide de l'ammoniaque qui a augmenté le taux de l'azote total obtenu sur la solution corrigée.)

Il est donc à noter que l'acide citrique, complètement dépourvu d'azote, intervient dans le métabolisme du microorganisme en expérience pour l'élaboration des matières protéiques contenues dans le corps microbien.

V. - Recherche du Pouvoir Tuberbulinique

Dans le présent chapitre nous relatons nos essais de recherche du pouvoir tuberculinique des différentes souches isolées par nous.

B. et E. Lange (1) avaient déjà formulé le fait que dans les milieux où on les cultive, les bacilles paratuberculeux produisent des substances analogues à la tuberculine. D'après les mêmes auteurs, on peut en préparer des extraits glycérinés qui, souvent, chez l'homme tuberculeux, mieux que chez les animaux, déterminent, mais seulement lorsqu'on les injecte à forte dose sous la peau ou dans le derme, une réaction fébrile ou des réactions locales semblables aux réactions tuberculiniques.

Les recherches de Moeller, Selter (2), Dietrich (3), E. Long (4), A. Boquet et L. Nègre (5), Aleva, ont également établi que les cultures des bacilles acido-résistants saprophytes contiennent des paratuberculines manifestant des propriétés analogues à celles de la tuberculine pour l'homme et les animaux tuberculeux. Tous ces auteurs s'accordent à reconnaître que l'activité des paratuberculines est toujours de 10 à 20 fois moindre que celle de la tuberculine.

Cependant des recherches plus récentes ont permis de démontrer que le pouvoir des bacilles paratuberculeux d'élaborer des substances tuberculiniques dans les milieux ambiants n'est pas le même pour les différentes souches. Chez certains même ce pouvoir est très faible ou presque inexistant, et les filtrats de culture de plusieurs souches, vieilles même d'un an, ne sont d'aucun effet sur les animaux tuberculeux auxquels on les inocule.

A. Borrel, Pinoy et Burnet (6), en 1904, à l'Institut Pasteur de Paris, n'ont jamais pu obtenir de tuberculine avec des extraits glycérinés de cultures du bacille de la fléole de Moeller, non plus qu'avec celui du beurre, isolé par J. Binot (7). Ils n'ont pas réussi davantage à tuer des cobayes tuberculeux en leur injectant à haute dose des corps microbiens de ces mêmes bacilles, même par inoculation intracérébrale.

R. Laporte (8) a réussi, en 1939, avec une souche isolée du pus d'un abcès froid chez un enfant, à provoquer la mort de cobayes *sains* auxquels il injectait de 1 à 2 mg. de bacilles lysés. Cette souche présentait après quelques mois de cultures, un processus très particulier de lyse : elle devenait lisse, brillante, homogène et prenait une consistance muqueuse.

Une macération de cette souche lysée pendant quelques heures à l'étuve à 37° dans l'eau physiologique, donnait une solution, après filtration, qui ne produisait pas de réaction appréciable chez le cobaye sain, mais qui se comportait comme une tuberculine assez active lors-

qu'elle était inoculée dans la peau de cobayes allergiques. Les filtrats de culture du même bacille en milieu liquide, âgés de 3 à 4 semaines, étaient dépourvus d'activité tuberculinique, tandis que ceux des cultures vieilles contenaient des substances comparables par leurs propriétés à la tuberculine.

R. Laporte attribuait les mêmes propriétés à d'autres germes, tels le bacille du lait de Moeller et celui de la fléole, chez lesquels, ajoute-t-il, ils sont plus accusés encore que pour le bacille isolé du pus. Le pouvoir tuberculinique de ces souches peut atteindre selon lui, au bout de 15 à 20 semaines, celui des cultures de bacilles tuberculeux.

Pour d'autres souches, le phénomène de lyse se produisant avec une moindre intensité, ou ne se produisant pas du tout, le pouvoir tuberculinique est faible pour le cobaye tuberculeux.

Il ressort des travaux de R. Laporte que l'apparition tardive de la tuberculine dans les filtrats de cultures de bacilles acido-résistants, ainsi que sa valeur, dépendent de l'âge de la culture et de l'aptitude de la souche à présenter des phénomènes d'autolyse. Et plus l'autolyse sera grande, plus la quantité de protéides libérés par ce phénomène sera importante, plus grand sera le pouvoir tuberculinique.

D'autre part, F. Van Deinse (9), en 1939 également, avait constaté l'apparition tardive d'un pouvoir tuberculinique avec une souche de saprophyte acido-résistant, isolé en 1925 par E. Loukidis du produit de grattage d'un robinet.

Van Deinse n'a pu mettre en évidence ce pouvoir tuberculinique que dans les cultures sur Sauton vieilles d'un an environ. Il a établi une relation entre l'apparition du pouvoir tuberculinique et celle, simultanée, de la réaction xanthoprotéique que donnent, tardivement aussi, les milieux de Sauton ensemencés avec cette souche.

Reprenant ces expériences avec nos souches, nous avons voulu voir si les phénomènes d'autolyse et l'apparition tardive de la réaction xanthoprotéique étaient les précurseurs constants de l'apparition d'un pouvoir tuberculinique dans les cultures âgées.

Dans une note publiée dans les « Archives de l'Institut Pasteur de Tunis » (10), nous avons rapporté le cas de notre bacille Mb dont les filtrats de culture possédaient un pouvoir tuberculinique très intense pour les cultures âgées de moins de 12 semaines, et actifs dès la 3e semaine.

Conformément aux conclusions de Van Deinse, l'apparition du pouvoir tuberculinique a été concomitante de celle de la réaction xanthoprotéique. D'autre part, cette souche était bien douée d'un processus autolytique, mais le processus n'avait lieu qu'à partir de la 11e ou la 12e semaine, tandis que les filtrats étaient déjà actifs dès la 3e semaine.

La souche Mb a été ensemencée dans 7 ballons de Sauton contenant chacun 200 cc. de milieu. Le bacille, ainsi qu'il a été dit plus

haut, pousse très rapidement à l'étuve et forme déjà à la fin de la première semaine un voile mince, assez important. Chaque semaine un ballon de culture est filtré sur papier et les bacilles séchés à l'étuve et pesés. Sur le filtrat on mesure le pH, et on recherche la réaction xanthoprotéique par la méthode préconisée et décrite par Van Deinse (11), selon la technique de R. Lefaux (12).

La réaction xanthoprotéique, qui était très faiblement positive à la fin de la première semaine, devient nettement positive à la 2e semaine pour l'être fortement après 6 semaines, et très fortement à la 12e. A ce moment d'ailleurs, le milieu a un aspect légèrement sirupeux provenant très probablement de la forte quantité de bacilles lysés.

Les filtrats des cultures du bacille Mb sont alors chauffés à 100° pendant 30 minutes, et injectés à raison de 0 cc. 2 chacun dans le derme de cobayes tuberculeux, ayant reçu 4-5 semaines auparavant, sous la peau de la cuisse, une suspension assez forte de bacilles tuberculeux humains.

Nous nous sommes servi de 3 lots de chacun 3 cobayes tuberculeux. Les 3 cobayes du 1er lot reçoivent chacun en trois points différents de leur flanc, 0 cc. 2 de chacun des filtrats des 1re, 2e et 3e semaines. Les cobayes du 2e lot, 0 cc. 2 de filtrats des 4e et 5e semaines. Enfin, les cobayes du 3e lot, 0 cc. 2 des filtrats de 6 semaines et de 80 jours.

Le filtrat de la 1re semaine n'a provoqué aucune réaction cutanée, même après 48 heures. Mais à partir de la 2e semaine et jusqu'au 80e jour, la réaction dermique a été très nette, de plus en plus forte, accompagnée même de nécrose pour les filtrats de 6 semaines et de 80 jours. Une réaction fébrile a été également enregistrée chez tous ces cobayes.

Aucune réaction, ni dermique, ni fébrile, chez les cobayes sains témoins.

Dans une deuxième expérience, afin de titrer l'activité du Sauton obtenu par filtration de la culture de 80 jours, nous avons chauffé une certaine quantité du filtrat, à 100° pendant 30 minutes, et nous l'avons injecté à des cobayes tuberculeux de 5 semaines dans le péritoine, comme suit : le 1er a reçu 1 cc. du filtrat; le 2e, 2 cc.; le 3e, 3 cc.; le 4e, 4 cc. et le 5e, 5 cc. La température de ces cobayes a été prise toutes les heures.

D'après les courbes des fig. 4 et 5, la température du cobaye n° 5, qui a reçu la plus grande quantité, baisse rapidement après une légère poussée de 6/10 de degré, pour atteindre 34°7 au bout de 7 heures; l'animal meurt peu après, en hypothermie.

Chez les cobayes qui ont reçu 3 et 4 cc., la température, après

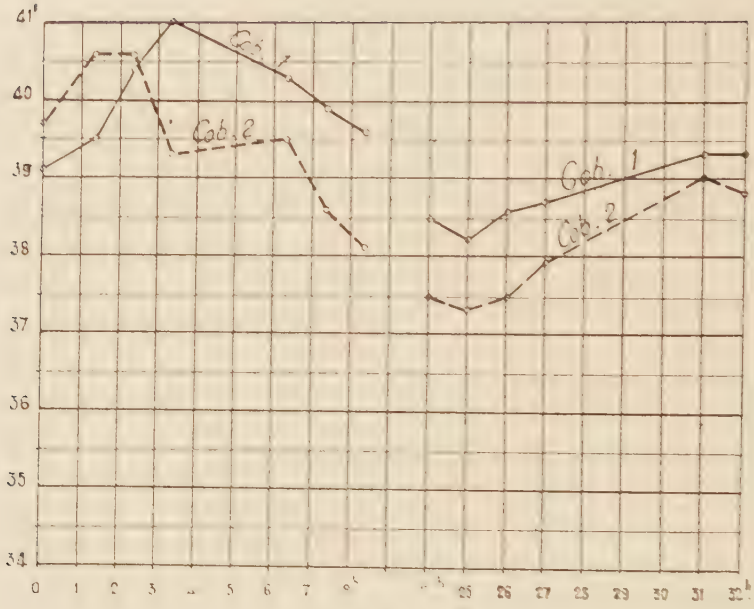

Fig. 4

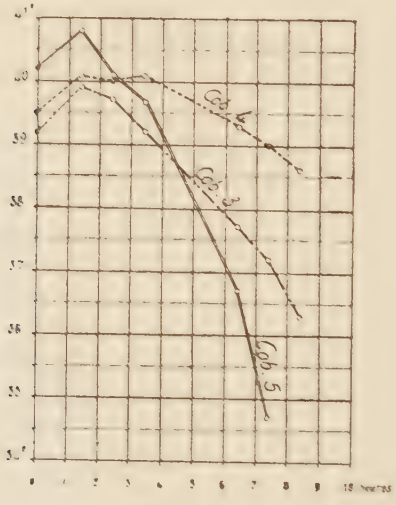

Fig. 5

une poussée fébrile, se met à baisser, toutefois moins rapidement que chez le cobaye n° 5, auquel ils survivent. Nous les avons trouvés morts le lendemain de l'inoculation, après moins de 24 heures. A l'autopsie, ces animaux présentaient une tuberculose généralisée;

aucune lésion de l'intestin. La dose de tuberculine paraît bien être la véritable cause de leur mort.

Les cobayes n^os^ 1 et 2 ont survécu, après une hausse de température, suivie d'une baisse jusqu'à 38° pour le cobaye n° 1 et 37°3 pour le cobaye n° 2. Au bout de 24 heures leur température a commencé à remonter pour revenir à la normale 33-34 heures après l'injection.

En second lieu, nous avons essayé de concentrer notre tuberculine, par la méthode employée pour la fabrication de la tuberculine brute.

Un ballon de culture de la souche Mb de 80 jours, sur 200 cc. de Sauton, est chauffé à 100° pendant une heure pour stérilisation. Le volume du liquide est ensuite réduit, au bain-marie dans une capsule de porcelaine au 1/6-1/7 de sa valeur initiale. Le résidu est enfin filtré sur papier.

Nous avons ainsi obtenu un liquide assez épais, brunâtre et ayant la même odeur de mimosa que la culture vivante. Avec ce liquide nous avons fait ensuite les dilutions suivantes : 1/10, 1/5 et 1/2.

En quatre points différents des flancs de 2 cobayes tuberculeux et d'un cobaye sain, nous injectons dans la peau 0 cc. 2 de chacune des dilutions préparées, ainsi que 0 cc. 2 du liquide épais obtenu.

Une réaction fébrile a suivi presque immédiatement chez les cobayes tuberculeux et a duré avec des oscillations pendant 48 heures.

En outre, la réaction cutanée a été très forte au bout de 24 heures : notable à la dilution de 1/10; une papule de 0 cm. 75 de diamètre environ à la dilution de 1/5; une autre d'un diamètre de 1 cm. à la dilution de 1/2 et enfin une grande papule de 1 cm. 5 à 2 cm. de diamètre pour le liquide épais non dilué. La 3^e^ et la 4^e^ papule étaient atteintes d'une forte nécrose après 24 heures, et toutes au bout de 48 heures.

Chez le cobaye sain aucune réaction appréciable.

Ces faits indiquent bien que le pouvoir tuberculinique des filtrats de cultures de la souche Mb de 80 jours est comparable et presque équivalent à celui de la tuberculine brute classique.

Nous avons répété ces expériences avec toutes les autres souches. Rappelons tout de suite que les souches T_2 et Mj sont douées de phénomènes de lyse très marqués aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La souche Ca_2 présente le même phénomène, mais seulement en milieu liquide, et au bout de 6 à 7 mois environ.

L'apparition de la réaction xanthoprotéique positive a été observée chez toutes les souches dont nous prélèvions des filtrats toutes les semaines. Le tableau n° 7 en donne les résultats :

TABLEAU N° 7

Evolution de la réaction xanthoprothéique dans les filtrats de cultures des différentes souches, sur le milieu de Sauton.

Temps en sem.	Souche T_1	Souche T_2	Souche T_3	Souche T_4	Souche Mb	Souche Mj	Souche Ca_2	Souche Ca_1
1	Négative	Négative	Négative	Négative	Très faib. posit.	Négative	Négative	Négative
2	Faibl. posit.	Très faib. posit.	»	»	Positive	Faibl. posit.	»	»
3	Positive	Positive	»	»	»	Positive	Faibl. posit.	»
4	»	»	»	Traces	»	»	Positive	»
5	»	»	»	»	»	»	»	»
6	»	»	Traces	»	Fort. positive	»	»	Traces
7	Fort. positive	Fort. positive	»	»	Très fort. posit.	»	»	»
8	Très fort. posit.	»	Faibl. posit.	Faibl. posit.	—	»	»	Faibl. posit.
9	—	»	—	»	—	Fort. positive	»	»
10	—	»	—	»	—	—	»	»
13	—	»	—	»	—	—	»	»
15	—	Très fort. posit.	—	Positive	—	—	—	Positive
23	—	»	—	»	—	—	—	»
33	—	»	—	—	—	—	—	»
36	—	Très fort. posit.	—	—	—	—	—	»

La souche Mb a été, de toutes nos souches, celle qui possède le pouvoir tuberculinique le plus grand. Ce pouvoir d'ailleurs est comparable à celui de la tuberculine brute diluée au 1/10. Le pouvoir de nos autres souches s'est révélé faible ou inexistant.

Les filtrats de la souche Ca_2, qui donne une réaction xanthoprotéique positive après 4 semaines, ne sont d'aucun effet sur les cobayes tuberculeux en injection intradermique jusqu'au 90e jour de la culture. Une assez faible réaction a lieu avec les filtrats de cultures âgées de plus de 90 jours, et la réaction devient assez forte, et même accompagnée de nécrose, au 250e jour.

Nous avons obtenu une très faible réaction cutanée avec des filtrats de 33 semaines de la souche Ca_1, qui ne donne une réaction xanthoprotéique positive qu'à la 15e semaine.

Les souches T_2 et T_4, pour lesquelles la réaction xanthoprotéique est positive à la 3e semaine (la souche T_2), et à la 23e semaine seulement pour la souche T_4, ne sont douées d'aucun pouvoir tuberculinique puisque des filtrats de 158 jours de la souche T_4 et de 105 jours de la souche T_2 ne donnent que de très faibles réactions, ou même pas de réactions du tout, en injection intradermique à des cobayes tuberculeux.

Quant aux souches T_1, T_3 et Mj, leurs filtrats ne sont absolument d'aucun effet sur les animaux tuberculeux : nous avons employé des filtrats de 140 jours pour les souches T_1 et T_2 et de plus de 12 semaines pour la souche Mj.

Il ressort de nos expériences que l'apparition de la réaction xanthoprotéique dans les filtrats de culture, et le pouvoir autolytique des souches, ne sont pas les seuls phénomènes responsables de l'apparition de la réaction tuberculinique.

La production de tuberculine s'accompagne de la réaction xanthoprotéique; mais la réaction xanthoprotéique peut se produire sans qu'il y ait production de tuberculine.

Les souches T_2, Mj et Ca_2, quoique douées d'un pouvoir autolytique assez intense, et donnant d'autre part des réactions xanthoprotéiques positives assez tôt, se sont révélées de faibles productrices de tuberculine.

Le pouvoir autolytique des souches est bien le processus grâce auquel des protéides de toutes sortes sont libérés dans le milieu sur lequel on les cultive. Mais pour que les filtrats d'une souche donnée soient actifs, il faut qu'en même temps soient libérés le ou les protéides spécifiques de la réaction tuberculinique, qui seraient d'après nous, différents de ceux qui donnent la réaction xantho-

protéique positive. Dans ce cas seulement l'on pourra dire que plus la libération des protéides par le processus de lyse est grande, plus grand sera le pouvoir tuberculinique.

La production de tuberculine est un caractère propre, pour ainsi dire individuel des souches qui en sont douées.

VI. - Essai de distinction de types sérologiques

Le moyen préconisé pour la classification des bacilles acido-résistants saprophytes repose sur leur propriété chromogène. Certains auteurs ont voulu croire que la couleur d'une culture est un signe caractéristique qui permet de classer une souche donnée dans un groupe de bacilles produisant la même teinte. C'est ainsi que l'on a proposé de classer les paratuberculeux en groupes orange, rose, blanc, jaune, rouge, etc... Mais cette méthode est sujette à caution, car le même bacille peut produire des tons différents dans la même teinte et même des couleurs différentes, suivant qu'on le cultive sur tel ou tel milieu, plus ou moins riche en glycérine, à l'étuve ou à la température ordinaire. Nous avons vu que notre bacille Mb, par exemple, prend une teinte rosée quand on le cultive sur le milieu de Löwenstein, et que la culture reste blanche sur la gélose glycérinée.

D'autre part, deux bacilles possédant la même couleur peuvent être tout à fait différents dans leurs caractères biologiques et dans leur métabolisme.

De toute manière, ce moyen de classification qui repose sur une appréciation morphologique « macroscopique », ne peut guère avoir de valeur au sens scientifique du terme, et ne peut servir pour un classement rationnel des bacilles acido-résistants saprophytes.

Ne serait-il pas plus logique de rechercher, parmi leurs nombreuses propriétés, quelques-unes qui seraient plus distinctives, et qui seraient en même temps mesurables ou décelables par un test de laboratoire que l'on pourrait toujours reproduire ?

Nous avons vu que l'on peut différencier certaines formes de variations du pH, en considérant les changements qui surviennent toujours dans le milieu quand on les cultive sur le milieu liquide de Sauton. Ainsi que l'ont préconisé Th. Smith, J. D. Aronson (sur bouillon glycériné), J. Bance (sur Sauton) et d'autres pour les bacilles tuberculeux pathogènes, cette méthode basée sur un caractère biochimique immuable, pourrait aussi bien servir dans la classification des bacilles acido-résistants paratuberculeux.

D'autre part, parmi les propriétés spécifiques dont on pourrait se servir dans ce but, les caractères sérologiques ne sont pas les moindres.

L'analyse de la spécificité sérologique des microbes pathogènes, ou non pathogènes, est devenue une des méthodes les plus importantes pour caractériser le nombre toujours croissant des espèces microbiennes et pour préciser leur structure ainsi que le mécanisme particulier de leurs actions biologiques.

C'est en se basant sur cette spécificité sérologique que l'on est arrivé à classer les méningocoques, à dresser le tableau sérologique du grand groupe des salmonelles ainsi que de plusieurs autres groupes de bactéries.

Dans le domaine des bacilles acido-résistants, les recherches ne sont pas aussi avancées. On n'a pu mettre en évidence, jusqu'ici, des différences sérologiques entre les bacilles tuberculeux des types humain et bovin, malgré les différences biologiques certaines qui existent entre eux. En ce qui concerne les bacilles acido-résistants saprophytes et les bacilles tuberculeux des animaux à sang froid, on peut dire qu'ils n'ont pas été jusqu'ici soumis à une étude sérologique approfondie, permettant de délimiter les espèces existantes.

S. Naito (1) a pu cependant extraire des substances précipitinogènes spécifiques de chacune des souches sur lesquelles il a travaillé, et qui ont été isolées du sol, des eaux d'alimentation et des eaux d'égouts. Ces substances étaient extraites des bacilles par le chauffage des cultures à 100° pendant 15 minutes dans une solution d'acide chlorhydrique N/20. Les solutions étaient purifiées par dialyse, filtrées et précipitées par l'acétone; la substance ainsi purifiée, séchée à l'étuve et dissoute dans l'eau physiologique, a la propriété de précipiter de manière spécifique en présence des sérums anti, obtenus par injections intraveineuses au lapin de 1 à 4 milligrammes des germes correspondants.

La spécificité des réactions de précipitation a permis à S. Naito de distinguer 16 types parmi 24 souches qui étaient réparties en 3 groupes d'après leurs caractères biologiques.

Les bacilles tuberculeux aviaires sont les seuls dans le groupe des acido-résistants à avoir bénéficié d'une étude sérieuse de leurs caractères sérologiques. Et cette étude a permis de distinguer parmi eux des types sérologiques différents, et de les classer en ces différents types.

J. Furth (2) a constaté le premier l'existence de différents types parmi les bacilles aviaires. En étudiant 6 souches isolées d'oiseaux tuberculeux et 4 autres souches d'origine non aviaire, mais ayant les mêmes caractères culturels, et isolées dans des conditions particulières, il a pu les classer en 3 groupes sérologiques d'après leur pouvoir fixateur de l'alexine et leur pouvoir absorbant à l'égard des anticorps des différents sérums. W. Schaefer (3) a examiné 34 souches de bacilles aviaires isolées d'oiseaux tuberculeux et il a constaté que toutes ces souches pouvaient être classées en deux groupes sérologiques, les bacilles de chaque groupe réagissant spécifiquement dans la réaction de fixation de

l'alexine, avec l'antisérum correspondant lorsque celui-ci a été préalablement privé de ses anticorps de groupe. Schaefer a trouvé, en outre, parmi les bacilles ayant les caractères culturels des bacilles aviaires, mais isolés de cobayes ou du sang de certains malades, deux autres groupes sérologiques. H. Harpoth (4) a étudié 21 souches de bacilles aviaires. Il arrive à la conclusion qu'il y a parmi ces bacilles au moins 5 groupes qui se distinguent soit par leur pouvoir absorbant différents pour les agglutinines de deux sérums anti-bacillaires aviaires, soit par leur pouvoir absorbant pour les agglutinines des sérums anti-bacillaires humains ou bovins. G. Chiti (5) a constaté également que les bacilles aviaires ne représentaient pas un groupe homogène au point de vue de leur composition antigénique.

Nous-même, travaillant avec W. Schaefer et H. Harpoth (6), avons pu identifier, d'après la technique de la distinction des types de Schaefer, le bacille aviaire rencontré le plus souvent au Danemark par Harpoth (18 fois sur 21) comme étant un bacille du type II d'après la classification de Schaefer. Par contre, un autre bacille, trouvé deux fois seulement par Harpoth, ne réagit avec aucun des anti-sérums des quatre types étudiés par Schaefer. Ce bacille injecté au lapin, fournit un anti-sérum qui, après absorption des anticorps de groupe, se montre strictement spécifique pour la souche homologue. Il s'agissait donc bien d'un type de bacille aviaire qui doit appartenir à un type sérologique particulier.

Nous avons essayé d'appliquer cette méthode à l'étude sérologique des 8 souches de bacilles acido-résistants saprophytes isolées par nous, selon la technique employée par Schaefer : la méthode consiste en la réaction de fixation du complément associée à la méthode de l'absorption des anticorps fixateurs.

Ainsi que l'a fait Schaefer, nous avons préparé des anti-sérums en injectant à des lapins, deux fois par semaine, 5 à 10 milligrammes d'une suspension de nos bacilles cultivés sur le milieu de Löwenstein, et stérilisés pendant une heure au bain-marie à 80°. Les animaux étaient sacrifiés après 8 à 10 injections et leur sérum était stérilisé en ajoutant pour 10 cc. de sérum 1 cc. de la solution suivante : acide phénique, 5 gr.; glycérine, 5 gr.; eau physiologique, 100 cent. cubes. Les sérums ainsi traités conservaient indéfiniment leur activité.

Pour la réaction de fixation du complément nous nous sommes servi, comme antigène, de suspensions bacillaires en eau physiologique préparées de la manière suivante :

De chacune de nos souches nous prélevions avec une petite spatule 2 milligrammes de la culture vivante, et nous l'émulsionnions contre les parois d'un tube de verre contenant 10 cent. cubes

d'eau physiologique. Nous amenions les suspensions des différentes souches à la même densité optique en utilisant, comme émulsion standard, une suspension de staphylocoques en eau physiologique contenant 300.000.000 de germes par cent. cube. Ces suspensions ne possèdent aucun pouvoir anti-complémentaire et peuvent être conservées à la glacière sans inconvénient pendant plusieurs jours.

La réaction de fixation du complément est effectuée de la façon suivante :

Des doses décroissantes d'anti-sérum (1/10 : 0,25 — 0,15 — 0,10; 1/50 : 0,25 — 0,15 — 0,10; 1/250 : 0,25 etc.), amenées au volume constant de 0,25 cc., sont mélangées avec 0,25 cc. de l'antigène (suspension bacillaire) et avec 0,25 cc. d'alexine diluée au 1/15. On met les mélanges pendant une heure à l'étuve, puis on ajoute 0,5 cc. d'un mélange à parties égales de sérum hémolytique (1 doses minima lysantes), et de globules rouges à 1/10. On note les résultats après une demi-heure de séjour à l'étuve lorsque la réaction est complètement achevée.

Dans les expériences d'absorption des anticorps, nous procédions de la façon suivante :

100 milligrammes de corps bacillaires, desséchés et pulvérisés, sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique. On les émulsionne dans 10 à 15 cent. cubes de l'anti-sérum préalablement inactivé et dilué (au 1/5 ou au 1/20 selon son titre), et on porte le mélange à l'étuve pendant une heure en l'agitant toutes les 10 minutes. Puis on le met à la glacière pendant au moins un quart d'heure ou jusqu'au lendemain; on centrifuge fortement jusqu'à éclaircissement complet, on décante et on inactive le sérum encore une fois par chauffage à 56° pendant 5 minutes. Les sérums ainsi traités n'ont aucun pouvoir empêchant, et on les dilue pour la réaction de fixation du complément, comme les résums non absorbés.

Les résultats que nous avons obtenus sont donnés dans les tableaux n° 8 et n° 9.

Les tableaux n^{os} 8 et 9 montrent le comportement de nos souches vis-à-vis des sérums correspondants ou des sérums obtenus par injection des autres souches à des lapins.

Le tableau n° 8 représente les réactions faites avec les sérums employés tels quels, c'est-à-dire sans avoir subi une absorption préalable par une souche hétérologue.

Nous voyons tout d'abord que les souches T_4, Mb, Ca_2 et Ca_1 ne réagissent avec aucun autre sérum, tandis qu'elles empêchent nettement l'hémolyse quand elles sont mises en contact avec les sérums correspondants. Ceci prouve que ces souches produisent

TABLEAU N° 8

Types sérologiques

SERUMS		Suspensions bacillaires								
		T_1	T_2	T_3	T_4	Mb	Mj	Ca_2	Ca_1	Pisciaire
A. Sérum T_1										
1/5	0,25	+	+	p	—	—	+	—	p	—
	0,15	+	+	—	—	—	+	—	—	—
	0,10	+	+	—	—	—	+	—	—	—
1/25	0,25	+	+	—	—	—	+	—	—	—
	0,15	+	+	—	—	—	+	—	—	—
	0,10	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1/125	0,25	+	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Sérum T_2										
1/10	0,25	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,10	+	+	+	—	—	+	—	—	—
1/50	0,25	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	+	+	+	—	—	p	—	—	—
	0,10	+	+	+	—	—	—	—	—	—
1/250	0,25	—	+	—	—	—	—	—	—	—
C. Sérum T_3										
1/10	0,25	—	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	—	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,10	—	+	+	—	—	+	—	—	—
1/50	0,25	—	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	—	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,10	—	+	+	—	—	—	—	—	—
1/250	0,25	—	—	+	—	—	—	—	—	—
	0,15	—	—	+	—	—	—	—	—	—
D. Sérum Mb										
1/10	0,25	p	—	—	—	+	—			—
	0,15	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	0,10	—	—	—	—	+	—	—	—	—

TABLEAU N° 8 (suite)

Types sérologiques

SERUMS		Suspensions bacillaires								
		T_1	T_2	T_3	T_4	Mb	Mj	Ca_2	Ca_1	Pisciaire
1/50	0,25	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	0,15	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	0,10	—	—	—	—	+	—	—	—	—
1/250	0,25	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	0,15	—	—	—	—	+	—	—	—	—
E. Sérum Mj										
1/10	0,25	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,10	+	+	+	—	—	+	—	—	—
1/50	0,25	+	+	+	—	—	+	—	—	—
	0,15	+	+	—	—	—	+	—	—	—
	0,10	+	+	—	—	—	+	—	—	—
F. Sérum Ca_2										
1/5	0,25	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	0,15	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	0,10	—	—	—	—	—	—	+	—	—
1/25	0,25	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	0,15	—	—	—	—	—	—	+	—	—
	0,10	—	—	—	—	—	—	+	—	—
G. Sérum Ca_1										
1/5	0,25	p	—	—	—	—	—	—	+	—
	0,15	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	0,10	—	—	—	—	—	—	—	+	—
1/25	0,25	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	0,15	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	0,10	—	—	—	—	—	—	—	+	—
1/125	0,25	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	0,15	—	—	—	—	—	—	—	+	—

+ : fixation complète; p : hémolyse partielle; — : hémolyse complète.

TABLEAU N° 9

Types sérologiques

SERUMS		Suspensions bacillaires			
		T_1	T_2	T_3	Mj
A. Sérum T_1 absorbé avec souche T_3					
1/10	0,25	+	p	—	—
	0,15	+	—	—	—
	0,10	+	—	—	—
1/50	0,25	+	—	—	—
	0,15	+	—	—	—
	0,10	—	—	—	—
B. Sérum T_2 absorbé avec souche T_3					
1/20	0,25	—	+	p	+
	0,15	—	+	—	+
	0,10	—	+	—	+
4/100	0,25	—	+	—	+
	0,15	—	+	—	p
	0,10	—	+	—	—
1/500	0,25	—	+	—	—
C. Sérum T_3 absorbé avec souche T_1					
1/10	0,25	—	—	+	—
	0,15	—	—	+	—
	0,10	—	—	+	—
1/50	0,25	—	—	+	—
	0,15	—	—	+	—
	0,10	—	—	+	—
D. Sérum Mj absorbé avec souche T_3					
1/10	0,25	—	+	—	+
	0,15	—	+	—	+
	0,10	—	+	—	+
1/50	0,25	—	+	—	+
	0,15	—	+	—	+
	0,10	—	—	—	+

+ : fixation complète; p : hémolyse partielle; — : hémolyse complète.

chez les animaux auxquels on les injecte des anticorps qui leur sont strictement spécifiques, et l'on peut dire que chacune d'elles représente un type à part, bien déterminé, de bacilles acido-résistants.

Il n'en est pas de même pour les souches T_1, T_2, T_3 et Mj. En effet, le tableau n° 8 nous montre bien que ces quatre souches réagissent toutes en même temps, et avec la même intensité avec les anti-sérums des souches T_2 et Mj; que le sérum T_1 réagit avec les souches T_1, T_2 et Mj, et que le sérum T_3 fixe l'alexine aussi bien avec la souche correspondante qu'avec les souches T_2 et Mj. Pourrait-on conclure que ces 4 souches font partie du même groupe résologique ? Mais alors pourquoi les antisérums T_1 et T_3 ne réagissent-ils pas respectivement avec les souches T_3 et T_1 ? Ne devrait-on pas rendre les anticorps de groupe responsable de la fixation de l'alexine dans les différentes réactions tentées avec ces sérums ?

Pour élucider cette question nous avons été amené à nous servir d'anti-sérums qui ont été préalablement traités selon la méthode de l'absorption des anticorps, par les bacilles d'une souche acido-résistante hétérologue.

Les anti-sérums T_1, T_2 et Mj ont été absorbés avec la souche T_3 et l'anti-sérum T_3 avec la souche T_1.

Le tableau n° 9 nous donne les résultats obtenus avec cette deuxième série de réactions : les sérums T_1 et T_3 deviennent strictement spécifiques pour les souches correspondantes, tandis que les anti-sérums des souches T_2 et Mj fixent indifféremment l'une et l'autre de ces souches. Les souches T_2 et Mj forment donc bien un même type sérologique.

Nous avons fait réagir tous nos anti-sérums avec la souche Pisciaire, et cette souche n'a fixé l'alexine avec aucun d'entre eux. Ce qui prouve que la souche Pisciaire ne possède aucun antigène comparable sérologiquement à ceux de nos souches.

Nous pouvons donc conclure que par la méthode de fixation du complément associée à celle de l'absorption des anticorps, nous avons pu distinguer 7 types sérologiques différents, parmi nos 8 souches de bacilles acido-résistants saprophytes.

Appliquée à un plus grand nombre de souches, cette méthode pourrait peut-être servir à une classification des bacilles paratuberculeux, et par la détermination sérologique des types, faciliter grandement l'identification des souches acido-résistantes que l'on pourrait rencontrer.

VII. - Sommaire et conclusions

I. — Les bacilles acido-résistants paratuberculeux saprophytes sont des microorganismes qui possèdent certaines des propriétés morphologiques des bacilles tuberculeux vrais. Comme ces derniers, ils ont le pouvoir de résister à l'action décolorante des acides dilués ou de l'alcool, quand ils ont déjà été colorés, sous l'action de la chaleur, par une couleur d'aniline.

Ce groupe de bacilles est très répandu dans la nature, et les sources dont on peut les isoler sont extrêmement variées. On les trouve notamment dans la salive, dans l'urine et sur la peau de personnes ou d'animaux sains, et ceci a été bien souvent une cause d'erreur dans le diagnostic de la tuberculose.

Certains moyens peuvent cependant permettre de les distinguer des bacilles tuberculeux vrais : ils sont plus facilement décolorables que ces derniers par un mélange d'acide et d'alcool, ils poussent plus facilement et plus rapidement qu'eux sur des milieux assez simples et ne sont pas réinoculables en séries aux animaux d'expérience. Mais ces divers moyens n'ont qu'une valeur relative, et certaines souches de bacilles paratuberculeux peuvent très bien résister à l'action décolorante d'un mélange d'acide et d'alcool.

Cette très grande ressemblance des bacilles paratuberculeux avec les tuberculeux vrais est la cause de l'intérêt qu'on leur porte, car on ignore encore le rôle exact qu'ils peuvent jouer dans la nature.

Leur propriété d'acido-résistance, qui les rapproche le plus des bacilles tuberculeux, semble être un caractère qui fait, pour ainsi dire, partie de leur patrimoine héréditaire. Seule une étude approfondie de ces bacilles et de toutes leurs propriétés permettra de leur assigner une place dans la classification des microbes, et de connaître quel est leur vrai rôle dans le grand cycle de désintégration et de régénération de la nature.

II. — Nous avons constaté la présence de bacilles acido-résistants dans 9 échantillons de sol sur 9 examinés et prélevés en des endroits différents; dans 4 produits de grattage de robinets et de caoutchouc de robinets: dans les corps de mouches; dans le produit de raclage de plaies d'une truie; dans des matières fécales de lapin; dans des prélèvements, faits directement, du contenu de l'intestin grêle de mouton et de celui du gros intestin d'une vache;

sur une plante de la famille des Euphorbiacées, ainsi que sur diverses graminées.

De ces produits, nous avons réussi à isoler en cultures pures 9 souches qui nous ont servi pour le travail que nous nous sommes proposé : 4 souches viennent d'échantillons de sol (les souches T_1, T_2, T_3 et T_4); deux autres ont été isolées de produits de grattage de caoutchouc de robinets différents (les souches Ca_2 et Ca_1); deux autres proviennent de corps de mouches (les souches Mb et Mj); enfin une dernière souche (souche Truie), du produit de raclage des plaies que portait une truie sur toute la surface cutanée.

Nous nous sommes servi, pour l'isolement de ces souches, de la méthode d'enrichissement de Söhngen, qui consiste à introduire le produit à explorer dans un milieu synthétique complètement dépourvu de source habituelle de carbone, auquel on ajoute quelques gouttes de paraffine, de pétrole ou d'un autre hydrocarbure élevé, car les microorganismes que nous considérons possèdent le pouvoir d'emprunter le carbone qui leur est nécessaire à ces hydrocarbures. Pour la purification des souches, nous avons employé le milieu de Conn, contenant de la glycérine et du crystal violet à 1/10.000. Ce dernier corps, qui ne gêne pas les bacilles paratuberculeux dans leur développement, sert d'inhibiteur vis-à-vis des autres germes.

Nous nous sommes proposé d'étudier les caractères de ces souches : morphologiques, culturels, biochimiques, sérologiques, ainsi que leur pouvoir de production de tuberculine, et leur action sur les animaux de laboratoires, et d'essayer de trouver un moyen de les classer en nous basant sur un ou plusieurs de ces divers caractères.

III. — Les bacilles que nous avons isolés sont complètement dépourvus de virulence quand on les injecte, en suspension aqueuse, à des cobayes ou à des souris, par les voies sous-cutanée et intrapéritonéale.

Inoculés sous la peau, ils forment en 3-4 jours un abcès qui va grossissant et durcissant pendant 10-12 jours, et dans le pus duquel on peut voir, à l'examen microscopique, de nombreux bacilles acido-résistants mêlés à des leucocytes, si on sacrifie l'animal à ce moment; cet abcès commence alors à se résorber et finit par disparaître, en ne laissant aucune trace, après 20-25 jours. D'une façon générale, l'abcès n'est jamais accompagné d'engorgement ganglionnaire; les organes ne sont en aucun cas lésés et demeurent normaux et sains, même à la suite de l'inoculation intrapéritonéale.

Il en a été de même quand nous injections, en même temps que

la suspension bacillaire, et régulièrement tous les 2 jours à partir de l'inoculation, de l'extrait acétonique du bacille de Koch. Certains auteurs avaient réussi à exalter le pouvoir pathogène, inhibé ou affaibli, de certaines souches de bacilles tuberculeux, qui avaient perdu toute virulence pour le cobaye, en se servant de cet extrait.

Les substances ciro-graisseuses contenues dans cet extrait, et responsables du réveil de la virulence des bacilles tuberculeux affaiblis, paraissent donc sans influence sur l'évolution des lésions causées par les bacilles acido-résistants paratuberculeux.

Les résultats ont été tout autres quand nous avons inoculé nos bacilles, à des cobayes, en suspension dans l'huile de paraffine stérile, par les voies sous-cutanée et intrapéritonéale.

En effet, les inoculations de bacilles paratuberculeux isolés par nous, *vivants ou tués*, en suspension dans l'huile de paraffine, ont causé aux animaux d'expérience, en très peu de temps, des lésions extrêmement graves et souvent mortelles.

Par la voie sous-cutanée, nous avons obtenu très tôt des abcès qui atteignaient une grosseur considérable, des engorgements ganglionnaires avec pus et bacilles, des taches sur les poumons avec des bacilles à l'examen microscopique.

Par la voie intrapéritonéale, les lésions étaient plus graves. Les bacilles et l'huile causaient une péritonite exsudative, à fausses membranes recouvrant le foie, la rate, le diaphragme, avec engorgement de l'épiploon, du mésentère, des ganglions lombaires, et même des lésions sur les poumons. A l'examen microscopique nous retrouvions de nombreux bacilles un peu partout dans le pus et les organes.

Il est étonnant que des microorganismes inoffensifs par eux-mêmes acquièrent une si grande virulence quand ils sont associés à l'huile. Et c'est avec juste raison que A. Boquet dit « qu'un simple artifice de préparation et d'inoculation suffit pour promouvoir des bacilles acido-résistants saprophytes au rang de bacilles tuberculigènes ».

L'huile semble extraire des bacilles, vivants ou tués, une substance de nature lipoïdique qui, venant en contact avec les organes des animaux inoculés, forme les membranes qu'on rencontre à l'autopsie des animaux. Mais ce n'est sans doute pas la seule action de l'huile. L'huile semble également conférer une protection aux bacilles, empêchant ainsi les leucocytes et les macrophages de poursuivre leur action destructive sur ces éléments étrangers quand ils sont introduits dans l'organisme, et leur permettant de pullu ler. Cette protection doit faciliter de beaucoup la tâche des bacilles

acido-résistants, et les lésions qu'ils sont alors libres de causer sans être détruits, s'ajoutent, pour ainsi dire, les unes aux autres, ce qui fait la gravité de ces lésions au bout de quelque temps.

L'action pathogène conférée aux bacilles paratuberculeux par l'huile de paraffine ne semble pas leur être proprement spécifique, puisque nous avons pu reproduire exactement les mêmes lésions en inoculant au cobaye, qui n'est pas réceptif vis-à-vis du bacille de Stephansky, ce bacille acido-résistant enrobé dans l'huile de paraffine.

IV. — L'étude des variations subies par le milieu de Sauton, quand on y cultive des bacilles paratuberculeux, nous a permis, par la mesure du pH, de distinguer 3 formes de courbes de variation parmi nos 8 souches étudiées : les souches T_2, T_3, T_4 et Mb font directement passer le pH du milieu de 7,1 à l'acidité dès la 1re semaine; les souches T_1 et Ca_1 restent jusqu'à la 3e semaine dans la zone neutre de 7,1 pour ne descendre qu'ensuite et passer lentement à l'acidité; les souches Mj et Ca_2 passent d'abord de pH = 7,1 à l'alcalinité jusqu'à 7,9 et le milieu ne devient acide qu'ensuite ou même s'arrête dans l'acidité, non loin de la zone neutre.

Th. Smith, J. D. Aronson, J. Bance et d'autres se sont servi des changements du pH du milieu pour la différenciation entre les bacilles tuberculeux des types humain, bovin et aviaire; nous pensons qu'on pourrait également se servir de ce moyen pour une classification des bacilles paratuberculeux basée sur un caractère biochimique immuable.

Nous avons, d'autre part, dressé un tableau de l'évolution de nos souches en milieu de Sauton, en fonction du temps (en semaines) et du poids des bacilles secs, en grammes, par litre de milieu.

Les dosages de l'azote total contenu dans les bacilles secs de nos souches, par la méthode de Kjeldahl, nous ont donné des valeurs qui concordent avec celles trouvées par d'autres auteurs, et montrent que la quantité d'azote total fournie par ces bacilles et par celui de la tuberculose est sensiblement la même, sauf pour la souche Ca_1 qui a donné un taux d'azote nettement inférieur.

La teneur de nos souches en matières grasses, a été établie avec la méthode d'épuisement des bacilles secs et pulvérisés dans un appareil Soxhlet.

Il ressort de nos dosages que la teneur en matières grasses des bacilles acido-résistants saprophytes isolés par nous est comparable pour plusieurs souches (Mb, Mj, Ca_2 et Ca_3) à celle des bacilles tuberculeux. Les souches T_1 et T_2 possèdent un taux de matières grasses de beaucoup inférieur.

D'autre part, nos bacilles ont cédé à l'alcool la plus grande partie de leurs matières grasses, contrairement à ce qui se passe chez les bacilles tuberculeux du type humain qui cèdent la plus grande partie de leurs matières grasses à l'éther. Ceci les rapproche davantage des types bovin, équin et surtout porcin des bacilles tuberculeux.

Nos souches se sont avérées en général plus riches que les bacilles tuberculeux en acides gras libres.

Une expérience unique, faite avec la souche Mb, nous a montré que cette souche peut parfaitement bien se développer sur le milieu de Sauton privé d'acide citrique, et que la quantité de bacilles secs récoltés alors, est plus grande que celle obtenue sur le milieu de Sauton ordinaire, aussi bien à pH = 7,1, qu'à pH = 4,9. Il est cependant curieux de noter que l'acide citrique, qui ne contient guère d'azote, intervient quand même dans l'élaboration des matières protéiques du bacille.

La souche Mb, d'autre part, ne pousse pas du tout sur le milieu de Sauton privé de glycérine, et est très sensible aux variations du pH du milieu, puisqu'elle ne se développe pas en milieu de Sauton ordinaire, mais non tamponné au phosphate bipotassique.

V. — Nous avons cherché à savoir si nos bacilles étaient doués d'un pouvoir tuberculinigène, et nous nous sommes demandé si ce pouvoir tuberculinigène est toujours accompagné, dans le filtrat, de la réaction xanthoprotéique positive, ou s'il ne survient dans le milieu qu'après l'autolyse de la culture ou d'une partie de la culture, ainsi que l'ont supposé Van Deinse et R. Laporte.

La souche Mb s'est montrée, de toutes nos souches, celle qui possède le pouvoir tuberculinique le plus grand. Ce pouvoir d'ailleurs est comparable à celui de la tuberculine brute diluée au 1/10. La réaction xanthoprotéique positive a été concomitante, avec cette souche, de la réaction tuberculinique. Avec la souche Mb, l'autolyse n'intervient qu'après 10 à12 semaines de culture, tandis que les filtrats sont déjà actifs dès la 3e semaine.

Le pouvoir tuberculinique des autres souches s'est révélé faible ou inexistant, bien que certaines d'entre elles soient douées d'un grand pouvoir autolytique et que la réaction xanthoprotéique positive apparaît relativement tôt, dans les filtrats de leurs cultures.

Il ressort de nos expériences que l'apparition de la réaction xanthoprotéique dans les filtrats de culture, et le pouvoir autolytique des souches, ne sont pas les seuls phénomènes responsables de l'apparition de la réaction tuberculinique.

La production de tuberculine s'accompagne de la réaction xan-

thoprotéique, mais la réaction xanthoprotéique peut se produire sans qu'il y ait production de tuberculine.

Les souches T_2, Mj et Ca_2, quoique douées d'un pouvoir autolytique assez intense, et donnant d'autre part la réaction xanthoprotéique assez tôt, se sont révélées faibles productrices de tuberculine.

Le pouvoir autolytique des souches est bien le processus grâce auquel des protéides de toutes sortes sont libérés dans le milieu; mais pour que les filtrats d'une souche donnée soient actifs, il faut qu'en même temps soient libérés le ou les protéides spécifiques de la réaction tuberculinique qui seraient, d'après nous, différents de ceux qui donnent la réaction xanthoprotéique positive. En ce sens seulement on pourra dire que plus la libération des protéides par le processus de lyse est grande, plus grand est le pouvoir tuberculinique.

La production de tuberculine est un caractère propre, pour ainsi dire individuel, des souches qui en sont douées.

VI. — Certains auteurs se sont attachés à la propriété chromogène des bacilles paratuberculeux pour les classer en groupes différents. Ils ont admis que la couleur d'une culture est un caractère fixe, qui apparaît chez les souches biologiquement parentes. Mais ce procédé paraît bien insuffisant pour le rôle qu'on lui assigne, car une même souche peut pousser sur deux milieux différents en produisant des couleurs différentes.

Il est préférable de se baser sur des caractères plus spécifiques, et mesurables par des tests de laboratoire.

Nous avons montré qu'en considérant l'action biochimique de nos souches, nous avons pu distinguer des formes différentes de l'évolution du pH du milieu sur lequel on les cultive.

Mais les caractères sérologiques semblent être plus indiqués pour une classification rationnelle des diverses souches des bacilles paratuberculeux. La méthode de la détermination sérologique de types de bacilles a déjà fait ses preuves dans la classification d'un grand nombre d'espèces bactériennes.

S. Naito a pu extraire des bacilles acido-résistants paratuberculeux saprophytes une substance précipitinogène spécifique qui lui a permis de distinguer 16 types différents parmi les 24 souches qu'il a étudiées, et qui étaient réparties en 3 groupes d'après leurs caractères biologiques.

Furth a pu distinguer 3 types sérologiques différents parmi les souches de bacilles aviaires qu'il a étudiées par la méthode de fixation du complément. Schaefer a pu distinguer 4 groupes. Nous-même, avec Schaefer et Harpoth, avons réussi à déterminer un cinquième type sérologique de bacilles aviaires.

Appliquant la méthode sérologique à nos 8 souches, nous avons pu distinguer 7 types différents, réagissant spécifiquement avec les anti-sérums correspondants.

Cette méthode pourrait être d'une très grande utilité dans la classification des bacilles acido-résistants saprophytes, à condition de l'appliquer à un grand nombre de souches; on arriverait sans doute à déterminer des types sérologiques qui faciliteraient la classification et l'identification des souches acido-résistantes qu'on rencontre dans la nature.

SECONDE THÈSE

Propositions données par la Faculté

Cytologie des Schizomycètes

Vu :
Le Président de thèse
R. MAIRE

Vu :
Le Doyen
L. ROYER

Vu et permis d'imprimer :
Alger, le 29 Mai 1941
Le Recteur
G. HARDY

Liste Bibliographique

I. - Introduction et Historique

1. Johne et Frotingham : *Zeits. f. Tiermedec;* 1895, t. 21, p. 438. — *Veter. Mag.:* janvier 1896.
2. Zahn : *Thèse Tübingen*, 1884; chez Schweizerbart, Stuttgart.
3. Alvarez et Tavel : *Arch. de physiolog. normale et patholog.:* 1885, 303.
4. Gottstein, Laabs, Bitter : *Virchow's Archiv.*, 1886, t. 106, p. 209.
5. de Giacomi : *Fortsch d. Med.*, 1883, t. 145.
6. C. A. Frey et W. A. Hagan : *J. Inf. dis.*, 1931, t. 49, p. 496.
7. Van Deinse et Hooghiemster : *C. R. Soc. de Biol.*, 1938, t. 129, p. 384.
8. Dubard, Bataillon et Terre : *Rev. de Tuberc.*, 1898, t. 6, p. 13. — *Soc. de Biol.*, 1897, t. 49, p. 446.
9. Kolle, H. Schlossberger et Pfannenstiel : *Deut. med. Woch.*, 1921, t. 48, p. 927.
10. Frei : *Centralbl. f. Bakt.* (1), 1911, t. 60, p. 161.
11. Porter : *J. Hyg.*, 1917, t. 16, p. 55.
12. W. D. Burner : *J. Infect. Dis.*, 1934, t. 55, p. 26.
13. Furth : *Journ. of Immunol.*, 1926, t. 12, p. 273.
14. W. Schaefer : *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, t. 58, p. 388.

II. - Isolement et caractères morphologiques

1. Frey et Hagan : *J. Inf. Dis.*, 1931, t. 49, p. 496.
2. F. Eichbaum : *Ergeb. der Hyg. Bakt.*, 1933, p. 84.
3. Jakobitz et Kayser : *Centralbl. f. Bakt.*, 1909/1910, t. 66 et 67.
4. Bablet, Van Deinse et Schwartz : *C. R. Soc. de Biol.*, 1938, t. 128, p. 350.
5. Th. Voiculescu : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, t. 131, p. 583.
6. R. Laporte : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, t. 130, p. 222.
7. Frey et Hagan : *J. Inf. Dis.*, 1931, t. 49, p. 496.

III. - Action sur les animaux de laboratoire

1. L. Nègre et A. Boquet : *C. R. Acad. des Sciences.*, séance du 3 mars 1924.
2. L. Nègre et J. Valtis : *C. R. Soc. de Biol.*, 1930, t. 105, p. 183.

(3) L. Nègre, J. Valtis et Laroche : *C. R. Soc. de Biol.*, 1931, t. 108, p. 482.
(4) L. Nègre, J. Valtis et Van Deinse : *C. R. Soc. de Biol.*, 1932, t. 110, p. 685.
(5) L. Nègre, J. Valtis, F. Van Deinse et Beerens : *Presse med.*, 24 déc. 1932, 103.
(6) L. Rabinowitsch : *Deut. med. Wochensch.*, 1897, p. 507.
(7) Petri : *Arbeit. aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 1898, t. 14, p. 1.
(8) Korn : *Centralbl. f. Bakt.* (1), 1899, t. 25, p. 532.
(9) Tobler : *Zeitsch. f. Hyg.*, 1901, t. 36, p. 1.
(10) Potet : *Les Paratuberculibacilles*, Thèse de Lyon, 1902.
(11) Moëllen : *Deut. med. Woch.*, 1898, t. 24, p. 376; 1902, t. 28, p. 466 et 718. — *Centr. f. Bakt.* (1), 1901, t. 30, p. 513.
(12) F. Bezançon et Philibert : *Congrès international de la Tuberc.*, 1905, 1, 148.
(13) Grassberger : *Münch. med. Woch.*, 1899, p. 341 et 382.
(14) H. Carré et P. Rinjard : *Rev. gener. de Med. Vet.*, 1926, 35, 1; 1934, 43, 777.
(15) W. A. Hagan et P. Lévine : *Jour. amer. vet. med. assoc.*, 1932, t. 81, p. 723.
(16) N. Rist : *Thèse de Paris*, 1938 : L'allergie conférée par les bacilles morts. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, t. 61, p. 121.
(17) A. Saenz et G. Canetti : *Presse médicale*, mai 1939, 42, p. 849.
(18) R. Laporte : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, t. 130, p. 611 et 1170. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, t. 65, p. 282.
(19) Th. Voiculescu : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, t. 130, p. 1448.
(20) Mudd S. et E. : *J. of Exp. Med.*, 1924, t. 40, p. 633 et 647; 1927, t. 46, p. 167.
(21) R. Laporte : *Ann. Inst. Pasteur*, 1940, t. 65, p. 282.
(22) N. Choucroun : *C. R. Acad. des Sciences*, 1939, t. 208, p. 1757, 1940, t. 210, 511.
(23) A. Boquet : *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, t. 63, p. 531.

IV. - Essai d'étude Physico-Chimique

(1) Théobald Smith : *J. Med. Research.*, 1904, t. 13, p. 253 et 405.
(2) Bang : *Centralbl. j. Bakt.*, 1907, t. 43, p. 34.
(3) Mohler et Washburn : *Bureau of Animal Industry Bull.*, 1907, t. 96, p. 78.
(4) Fibiger et Jensen : *Berl. Klin. Wochensch.*, 1908, t. 45, p. 2026.
(5) Griffith : *Royal comm. on Tuber.*, final report., 1911, part. 2, t. 1, p. 26.
(6) Grund : *J. Med. Research.*, 1911, t. 47, p. 30.
(7) Aronson J. D. : *J. Inf. dis.*, 1930, t. 47, p. 30.
(8) Bance : *J. Arch. Inst. Past. de Tunis*, 1940, t. 29, p. 463.
(9) Darzine : *Ann. Inst. Past.*, 1932, t. 49, p. 743.

(10) Kresling K. : *Ueber die Fettsubstanz der Tuberkelbazillen., Centr. f. Bakt.* (1), 1901, t. 30, p. 897.
(11) Chargaff, Pangborn et Anderson : *Biol. Chem.*, 1931, t. 90, p. 45.
(12) Hammerschlag : *Sitzungsber. d. k. Akad. d. Wissensch.*, déc. 1888. — *Centr. f. klin. Med.*, 1891, t. 12, p. 9.
(13) Weyl : *Deut. med. Wochensch.*, 1891, t. 7, p. 256.
(14) Ruppel : *Zeitschr. f. physiol. Chemie.*, 1898, t. 26, p. 218.
(15) Levene : *J. M. Research.*, 1901, t. 1, p. 135. — *Zeitschr. f. physiolo. Chemie.*, 1901, t. 32, p. 549; 1908, t. 56, p. 552.
(16) Auclair et Paris : *Arch. Méd. Exp.*, 1907, t. 19, p. 129; 1908, 20, 737. — *C. R. Acad. des Sciences*, 1907, 144, 278; 1908, 146, 31.
(17) Allilaire et Fernbach : *C. R. Acad. des Sciences*, 1920, t. 171, p. 375.
(18) Bulloch et Mac Leod : *J. of Hyg.*, 1901, t. 4, p. 1. — *Bull. Inst. Past.*, 1904, t. 2, p. 381.
(19) Schweinitz (de) et Dorset : *Annual Report Bureau of animal Industry.*, 1888. — *J. amer. Chem. Soc.*, 1895, 17, 605; 1898, 20, 618; 1903, t. 25, p. 354. — *Centr. f. Bakt* (1), 1896, t. 19, p. 707; 1898, t. 28, p. 993; 1902, t. 32, p. 186.
(20) Lobstein E. : *Thèse de Strasbourg*, 1922; édit. Gazette méd. de Strasbourg.

V. - Recherche du pouvoir tuberculinique

(1) Lange B. et E. : *Deut. Med. Woch.*, 1922, p. 248.
(2) Selter : *Deut. Med. Woch.*, 1922, p. 54 et 686. — *Beitr. z. Klin. d. Tuber.*, 1923, t. 55, p. 318.
(3) Dietrich : *Deut. Med. Woch.*, 1921, p. 406.
(4) Long E. : *Am. Rev. of. Tub.*, 1924, t. 9, p. 215.
(5) Boquet A. et Nègre L. : *C. R. Soc. de Biol.*, 1924, t. 91, p. 337. — *Ann. Inst. Past.*, 1926, t. 40, p. 11.
(6) Borrel A., Pinoy et Burnet : *Bull. Inst. Past.*, 1904, t. 2, p. 420.
(7) Binot J. : *Arch. de parasito.*, 1903, t. 7, p. 306.
(8) Laporte R. : *C. R. Soc. de Biol.*, 1940, t. 133, p. 420.
(9) Van Deinse F. : *C. R. Soc., de Biol.*, 1939, t. 132, p. 358.
(10) Cabasso V. : *Arch. Inst. Past. de Tunis*, 1940, t. 24, p. 285.
(11) Van Deinse F. : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, t. 131, p. 185.
(12) Lefaux R. : *Bull. de la Soc. de Chim. Biol.*, 1935, t. 17, p. 1882.

VI - Essai de distinction de types sérologiques

(1) Naito S. : *Japan. Jour. Exp. Med.*, 1938, t. 16, p. 53-63.
(2) Furth J. : *Jour. of Immunol.*, 1926, t. 12, p. 273.
(3) Schaefer W. : *Ann. Inst. Past.*, 1937, t. 58, p. 388.
(4) Harpoth H. : *Zeitschr. f. Tuber.*, 1938, t. 79, p. 140.
(5) Chiti G. : *Centr. f. Bkt.* (1), 1938, t. 142, p. 313.
(6) Cabasso V., Schaefer W. et Harpoth H. : *C. R. Soc. de Biol.*, 1939, 131, 969.

Table des Matières

		Pages
I.	— *Introduction et historique*	1
II.	— *Isolement et caractères morphologiques des souches*	6
III.	— *Action sur les animaux de laboratoire*	15
IV.	— *Essai d'étude physico-chimique*	30
V.	— *Recherche du pouvoir tuberculinique*	43
VI.	— *Essai de distinction de types sérologiques*	51
VII.	— *Sommaire et conclusions*	59
	Liste bibliographique	69